

# Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Rolle der Gentechnologie.....	1
1.2 Der Modellorganismus E. coli BW25113 .....	2
1.3 Katalysierte Reaktion des rekombinanten Proteins.....	3
1.4 Populationsheterogenität .....	4
1.5 Flowzytometrie.....	4
1.6 Proteomanalyse mittels LC - MS.....	5
1.7 Zielsetzung.....	6
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>7</b>
2.1 Material .....	7
2.2 Methoden.....	12
2.2.1 Stammhaltung .....	12
2.2.2 Kultivierung und Fixierung.....	12
2.2.3 DNA - Färbung mittels DAPI.....	12
2.2.4 Bestimmung des Membranpotentials.....	13
2.2.5 Flowzytometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	14
2.2.6 LC - MS Analyse der beiden <i>hyp1</i> - tragenden Stämme .....	15
2.2.6.1 <i>Membranfiltration</i> .....	15
2.2.6.2 <i>Verdau nach Membranfiltration</i> .....	16
2.2.6.3 <i>LC - MS Messung</i> .....	17
2.2.6.4 <i>Auswertung der massenspektrometrischen Daten</i> .....	17

<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>19</b>
3.1	Wachstumsverhalten des Expressionsstammes <i>putA_pEKE-hyp1</i> .....	19
3.2	Flowzytometrische Messungen.....	20
3.2.1	Flowzytometrische Untersuchung des Stammes <i>putA_pEKE-hyp1</i> .....	20
3.2.1.1	<i>DAPI - Färbung</i> .....	21
3.2.1.2	<i>Morphologische Eigenschaften</i> .....	22
3.2.1.3	<i>Membranpotentialbestimmung</i> .....	22
3.2.1.4	<i>Sortierung der Subpopulationen</i> .....	24
3.2.2	Sortierung der Subpopulationen des Stammes <i>pEKE-hyp1</i> .....	26
3.3	Proteomanalyse.....	28
3.3.1	Der Stamm <i>putA_pEKE-hyp1</i> .....	28
3.3.1.1	<i>Gesamtproteom</i> .....	28
3.3.1.2	<i>Sortierte Proben</i> .....	33
3.3.2	Der Stamm <i>pEKE-hyp1</i> .....	37
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>40</b>
	<b>Literatur .....</b>	<b>41</b>
	<b>Anlagen .....</b>	<b>47</b>
	<b>Anlagen, Teil 1 .....</b>	<b>A - 1</b>
	<b>Anlagen, Teil 2 .....</b>	<b>A - 17</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: katalysierte Reaktion von Hyp1 nach [16] .....	3
Abbildung 2: Schema Zip Tip Protokoll.....	16
Abbildung 3: Wachstumskurven 1) und 2) des Stammes <i>putA_pEKE-hyp1</i> .....	19
Abbildung 4: DNA - Verteilung (i) mit entsprechenden Mean - Werten (ii).....	20
Abbildung 5: (-/-) - Ansatz HK1, t = 14 h.....	21
Abbildung 6: (+/+) - Ansatz HK1, t = 14 h .....	21
Abbildung 7: (-/-) - Ansatz HK2, t = 14 h.....	21
Abbildung 8: (+/+) - Ansatz HK2, t = 14 h .....	21
Abbildung 9: (-/-) - Ansatz HK2, t = 14 h.....	22
Abbildung 10: Test verschiedener DiOC6(3) - Konzentrationen .....	23
Abbildung 11: Doppelfluoreszenz ethanolfixierter Zellen (-/- Ansatz).....	24
Abbildung 12: HK3, 7 h Inokulum, t = 2 h (+/+) .....	25
Abbildung 13: HK3, 7 h Inokulum, t = 3 h (+/+) .....	25
Abbildung 14: HK6, t = 0 h (+/+) .....	27
Abbildung 15: HK6, t = 1 h (+/+) .....	27
Abbildung 16: relative Hyp1 - Quantität des Stammes <i>putA_pEKE-hyp1</i> im Laufe des Wachstums (gerundete Werte), HK1 .....	28
Abbildung 17: relative Hyp1 - Quantität des Stammes <i>putA_pEKE-hyp1</i> im Laufe des Wachstums (gerundete Werte), HK2 .....	29
Abbildung 18: Vergleich der Hyp1 - Quantitäten in HK1 und HK2 (gerundete Werte).....	30
Abbildung 19: Vergleich Hyp1 und "housekeeping" Proteine <i>E. coli</i> , HK1 (gerundete Werte).....	30
Abbildung 20: Expressionsprofil von <i>putA_pEKE-hyp1</i> in HK1 .....	31
Abbildung 21: relative Hyp1 - Quantität, HK3.....	33
Abbildung 22: Hyp1 - Quantität je Zelle, HK3.....	33
Abbildung 23: Vergleich Proteine Zellzyklus, HK3.....	34
Abbildung 24: Vergleich Proteine im TCA - Zyklus, HK3.....	35
Abbildung 25: Vergleich der Proteine der Prolinbiosynthese, HK3.....	36
Abbildung 26: Vergleich der Proteine der Stressantwort, HK3.....	37
Abbildung 27: relative Hyp1 - Quantität, HK6.....	38
Abbildung 28: Hyp1 - Quantität je Zelle .....	38

Abbildung 29: Proteine der Prolinmetabolisierung und - biosynthese, HK6. ....	39
---	----

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>E. coli</i> BW25113 .....	2
Tabelle 2: Konzentrationen und Inkubationszeiten von CCCP und Valinomycin .....	13
Tabelle 3: Daten zur Erfassung der gemessenen Parameter .....	14
Tabelle 4: Lösungen für Zip Tip Protokoll .....	16
Tabelle 5: <i>E. coli</i> - Stämme für <i>MaxQuant</i> .....	18
Tabelle 6: Probenahme für die DAPI - Färbung .....	21
Tabelle 7: Zellzahlen der Gates R1, R2, R3 (HK3) .....	26
Tabelle 8: Zellzahlen der Gates R1 - R4 (HK6) .....	27

# Abkürzungsverzeichnis

(-/-)	Nichtinduktion (Kontrolle)
(+/-)	Induktion
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Calciumchlorid
CCCP	Carbonylcyanid - m - chlorophenylhydrazon
c ( $c_{\text{End}}$ )	Konzentration (Endkonzentration)
CID	<i>collision induced dissociation</i>
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Kupfer(II) - chlorid - Dihydrat
$d_{\text{Küvette}}$	Schichtdicke der Küvette
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
$\text{DiOC}_6(3)$	3, 3' - Dihexyloxacarbocyaniniodid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4', 6 - Diamidino - 2 - phenylindol
Difo	Dimethylformamid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
pEKE-hyp1	<i>Escherichia coli</i> BW25113_pEKE-hyp1
putA_pEKE-hyp1	<i>Escherichia coli</i> BW25113putA_pEKE-hyp1
ESI	Elektrospray Ionisierung
FCM	Flowzytometrie
$\text{Fe}^{2+}$	zweiwertiges Eisenion
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Eisensulfat - Heptahydrat
FL1	$\text{DiOC}_6(3)$ - Fluoreszenzintensität
FL4	DAPI - Fluoreszenzintensität

FSC	Vorwärtsstreulicht
gi	<i>gene identifier</i>
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borsäure
HCl	Salzsäure
HK	Hauptkultur
<i>hyp1</i> (Gen)	L - Prolin - trans - 4 - Hydroxylase
Hyp1 (Genprodukt)	
IPTG	Isopropyl - β - D - thiogalactopyranosid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
λ	Wellenlänge
LB	Luria Bertani
LC	Flüssigchromatographie
LITQ	<i>Linear Ion Trap Quadrupole Mass Filter</i>
M	Molar
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MeOH	Methanol
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter - Quecksilbersäule (1 mmHg = 1 Torr)
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	Manganchlorid - Tetrahydrat
<i>MOWSE</i>	<i>molecular weight search</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem - Massenspektrometrie
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	Dinatriummethylen-diamintetraessigsäure - Dihydrat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat - Dihydrat

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Natriummolybdat - Dihydrat
$\text{NaN}_3$	Natriumazid
Na - PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
NCBI - nr	<i>National Center for Biotechnology Information - non redundant</i>
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Ammoniumchlorid
nM	Nanomolar
$\text{O}_2$	molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
$\text{OD}_{600} / \text{OD}_{700}$	optische Dichte, die bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ bzw. $700 \text{ nm}$ gemessen wird
PCS II	<i>Peptide Calibration Standard</i>
PI	Propidiumiodid
PutA ( <i>putA</i> )	<i>Prolin utilization</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphasen - Chromatographie
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS - PAGE	Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	Seitwärtsstreulicht
PIR	<i>Protein Information Resource</i>
t	Zeit
TCA	Tricarbonsäure
TOF	<i>time of flight</i>
U	Umdrehungen
v/v	Volumen pro Volumen
VK	Vorkultur
w/v	Gewicht pro Volumen
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\text{ZnSO}_4$	Zinksulfat



# 1 Einleitung

Die Weiße Biotechnologie, oder auch Industrielle Biotechnologie genannt, bezeichnet das Anwenden von biologischen, chemischen oder biochemischen Prozessen im Rahmen der industriellen Produktion. [1] [2] [3] Hierbei können eine große Anzahl von Endprodukten durch die Nutzung lebender Zellen oder Enzymen hergestellt werden, wie bspw. Antibiotika, Aminosäuren, Vitamine, Antikörper, Pestizide usw. [1] So können die Stoffwechselleistungen einiger Mikroorganismen zur Durchführung von chemischen Reaktionen verwendet werden. [2] [3] Im Rahmen dieser Arbeit werden Biotransformationsprozesse betrachtet. Unter Verwendung eines Wachstumssubstrates wird ein weiteres Substrat in ein gewünschtes Endprodukt umgewandelt. [4] Im vorliegenden Fall wird Glukose für das mikrobielle Wachstum und der Aufrechterhaltung der zellulären Aktivitäten verwendet und L - Prolin als Edukt für den Transformationsprozess. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Expression der gewünschten Biomoleküle ist jedoch die Entwicklung effizienter Expressionssysteme. [3] [5]

## 1.1 Die Rolle der Gentechnologie

„Der Begriff Gentechnologie beschreibt die Gesamtheit der Methoden zur Identifizierung, Isolierung, Vermehrung, Analyse und Expression von Genen in transformierten bzw. transfizierten Zellen.“ [6] Das Prinzip der gentechnologischen Produktion rekombinanter Proteine umfasst mehrere Schritte. So werden Abschnitte der Nukleinsäure (meist DNA) gezielt verändert und neukombiniert („Rekombination“), anschließend erfolgt das Einschleusen dieser Moleküle mittels spezifischer Vektoren, wie bspw. Plasmide, in geeignete Empfänger. Daraufhin kommt es zur Vermehrung der rekombinanten DNA in den lebenden Zellen. [6] Im Gegensatz zu dem gezielten Einbringen von Genen existiert weiterhin die Modifikation des Genoms, mit dem Ziel der Inaktivierung spezifischer einzelner Gene („*knock - out*“). [7] Im Rahmen der Weißen Biotechnologie spielt die Gentechnologie somit eine prägnante Rolle, da die verwendeten Organismen mit gentechnischen Methoden in der Art verändert werden können, dass die Ausbeute der heterologen Proteinexpression optimiert wird. [1] [5] [8] Außerdem werden häufig GVOs (siehe 1.2) eingesetzt, um die Fermentations - bzw. Biotransformationsprozesse so sicher wie möglich zu gestalten. [9]

## 1.2 Der Modellorganismus *E. coli* BW25113

Der fakultativ anaerobe, gramnegative, peritrich begeißelte, stäbchenförmige Organismus *E. coli* ist wohl der am besten charakterisierte Prokaryot. Er gehört zur Familie der Enterobacteriaceae (griechisch: *enteron* (Darm)). [10] Aufgrund der einfachen Kultivierungsbedingungen, des Wissens über dessen Genom und der Biochemie eignet sich der Stamm *E. coli* BW25113 (BW: Barry L. Wanner) im Rahmen dieser Arbeit besonders gut. [11] Dieser GVO gehört zu den *E. coli* K - 12 Derivaten, welche aufgrund ihrer Sicherheitsmerkmale häufig für Laborzwecke verwendet werden. [12] Charakteristische genotypische Merkmale des Stammes BW25113 sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: *E. coli* BW25113

Stamm	Genotyp	Referenzen
BW25113	$\Delta(araD-araB)567 \Delta lacZ4787(::rrnB-3) \Delta rph-1 \Delta(rhaD-rhaB)568$ <i>hsdR514</i>	[7] [13]

Zum Einsatz kamen die beiden Stämme pEKE-*hyp1* und *putA*\_pEKE-*hyp1*, wobei letzterer den Expressionsstamm für Hyp1 darstellt. Im Folgenden sollen die einzelnen Bezeichnungen erläutert werden. Der Organismus *E. coli* BW25113 erhielt das Plasmid mit der Bezeichnung pEKE. Dieser „shuttle vector“ für die kontrollierte Genexpression besitzt u. a. einen Replikationsursprung (ori), eine „Multiple Cloning Site“, eine Kanamycin - Resistenz und weiterhin erlaubt das Plasmid eine IPTG induzierte Expression von downstream klonierten Genen. [14] Es handelt sich um einen „leaky“ Promotor, da durch den lac - Promotor immer eine bestimmte Hintergrundexpression vorhanden ist. [15] Weiterhin zeichnen sich beide Stämme durch eine neukombinierte Plasmid - DNA aus, d.h. pEKE enthält das Gen zur Expression von Hyp1. Dieses Gen stammt aus *Dactylosporangium sp.* [16], sodass es sich um eine heterologe Proteinexpression von Hyp1 handelt. Zudem wurde im Stamm *putA*\_pEKE-*hyp1* eine Deletion des *putA* - Gens in der genomischen DNA vorgenommen. Der für *putA* codierende DNA - Abschnitt führt zur Expression eines Flavoproteins (PutA), welches in vielen Organismen L - Prolin zu L - Glutamat oxidiert. Der erwähnte Oxidationsvorgang wird durch eine 2 - Schritt Reaktion charakterisiert, die von menschlichen Zellen bis hin zu einigen Bakterien neben der Prolindehydrogenase noch die sogenannte 1 - Pyrrolin - 5 - carboxylat Dehydrogenase beinhaltet. [17] [18] Anders verhält sich dies v. a. in Enterobacteriaceae (bspw. *E. coli*), da beide Reaktionen durch ein bifunktionelles membranassoziertes PutA - Enzym ausgeführt werden. [18] [19] Das zytoplasmatische PutA hingegen fungiert als transkriptioneller Repressor der *put* - Gene. [19] Die Metabolisierung von L -

Prolin zu L - Glutamat soll jedoch im Expressionsstamm *putA\_pEKE-hyp1* verhindert werden, da möglichst das gesamte L - Prolin zu trans - 4 - Hydroxy - L - prolin transformiert werden soll.

Im Gegensatz zur chemischen Synthese erfolgt die Verwendung nachwachsender Rohstoffe durch den Einsatz eines Ganzzellkatalysators [1] [20], Energie - und Entsorgungskosten können durch Reaktionen bei Raumtemperatur und Normaldruck minimiert werden [1] [3] [21] und die Umwelt wird durch Ausschluss aggressiver chemischer Agenzien geschont. [21] [22] Jedoch können gleichzeitig mitunter ungünstige Produkt/ Volumen/ Zeit - Ausbeuten auftreten. [23] Außerdem müssen Fermentations - bzw. Aufbereitungswässer unter Einhaltung von gesetzlichen Vorschriften (insbesondere im Bezug auf GVOs) entsorgt werden. [22] [23] [24]

### 1.3 Katalysierte Reaktion des rekombinanten Proteins

Die mikrobielle zytoplasmatische Hyp1 katalysiert die Transformation von freiem L - Prolin in trans - 4 - Hydroxy - L - prolin (siehe Abb. 1). [16]

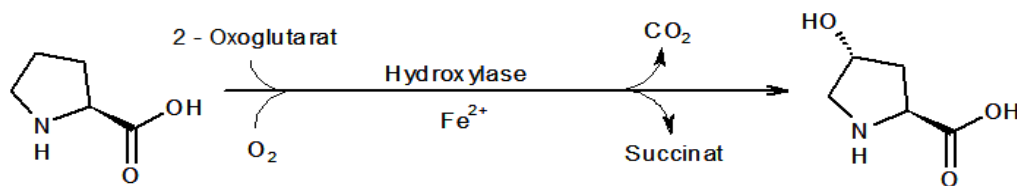


Abbildung 1: katalysierte Reaktion von Hyp1 nach [16]

Dieses Enzym zählt zu den Oxidoreduktasen, welche Redoxreaktionen katalysieren. Hierbei handelt es sich um eine Dioxygenase, die ein Sauerstoffatom aus dem O<sub>2</sub> - Molekül in das Substrat (L - Prolin) und das andere in das Kosubstrat einführt. [25] [26] [27] In dieser Reaktion dient 2 - Oxoglutarat (Zwischenprodukt im Citratzyklus) als Kosubstrat. [25] [28] Das Protein Hyp1 enthält außerdem als Kofaktor ein Fe<sup>2+</sup> - Ion im aktiven Zentrum. Dieses Übergangsmetall ist in der Lage mit dem molekularen Sauerstoff einen Komplex zu bilden, sodass dieser aktiviert wird. [27] Neben Succinat entsteht weiterhin CO<sub>2</sub> als Nebenprodukt der Biotransformation. Bei dieser Transformation handelt es sich um eine stereoselektive Synthese eines chiralen organischen Endproduktes. Bei der Verwendung biotechnologischer Methoden im Gegensatz zu chemischen Synthesen, werden dabei oft bessere Ausbeuten ermöglicht. So sind in dieser Hinsicht anschließende Aufreinigungs - und Trennverfahren der Produkte nicht notwendig. [1] [22] [29]

## 1.4 Populationsheterogenität

Eine Population – von Bakterien bis hin zu Säugetierzellen – zeichnet sich durch asynchrone Zustände der einzelnen Individuen aus. [30] Demnach befinden sich die Organismen einer mikrobiellen Kultur in unterschiedlichen genetischen, physiologischen, metabolischen sowie funktionellen Stadien. Aufgrund dessen ist eine Untersuchung dieser geno - und phänotypischen Heterogenitäten auf Einzelzellebene unerlässlich, da die Betrachtung auf Populationsebene ausschließlich den Gesamtzustand der Population widerspiegelt. [31] Der Ursprung der Heterogenitäten liegt u. a. in genetischen Unterschieden, so können spontane Punktmutationen oder der Verlust von Plasmiden auftreten. [32] Weiterhin beeinflussen Mikroumweltbedingungen eine bakterielle Population, d.h. lokal unterschiedliche Nährstoffangebote des Mediums, sodass physiologische Heterogenitäten die Folge sind. [33] Außerdem kann der Ursprung im bakteriellen Zellzyklus begründet sein [34], so zeichnen sich die Zellen bspw. durch eine unterschiedliche Anzahl an Chromosomenäquivalenten aus. Durch eine Einzelzellanalyse können demnach Subpopulationen detektiert werden, die sich durch unähnliche Eigenschaften unterscheiden. Hierfür dienen Charakteristika wie bspw. DNA - Gehalt, Granularität oder Morphologie. [35] Die Identifizierung und eventuelle Separierung der mikrobiellen Individuen mit vorteilhaften Eigenschaften einer Population ist v. a. für die Effizienzsteigerung eines biokatalytischen Prozesses von herausragender Bedeutung. [31] Traditionelle Untersuchungen mittels Ausplattierung und Lichtmikroskopie sind jedoch für einige Anwendungen ungeeignet, sodass es zur Entwicklung von rechnerunterstützten und bildgebenden Technologien, sowie kultivierungsunabhängigen Methoden kam.

## 1.5 Flowzytometrie

Mit Hilfe der FCM können die physiologischen Zustände der Individuen einer Population analysiert werden, da in jeder Population eine Heterogenität zwischen den einzelnen Zellen aufgrund der asynchronen physiologischen Zustände vorliegt. Um die Dynamik mikrobieller Populationen verfolgen zu können, werden funktionelle, als auch strukturelle Parameter erfasst. [36] Dabei können intrinsische sowie extrinsische Parameter charakterisiert werden, bei letzteren erfolgt die Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen. [37] Mit Hilfe der kombinierten Nutzung von Fluoreszenz - und Streulichtmessungen können multiparametrische flowzytometrische Messungen vorgenommen werden. Weiterhin bietet die FCM die Möglichkeit der anschließenden Zellsortierung, um weitere Untersuchungen mit den separierten Zellen vornehmen zu können. [31]

In einem Flowzytometer wird der Probenstrom mit den zu analysierenden Zellen durch einen Hüllstrom geleitet, sodass es zu einer starken Verengung des Probendurchmessers kommt. [38]

Durch diese hydrodynamische Fokussierung können die Zellen einzeln an einem oder mehreren fokussierten Laserstrahlen vorbeigeleitet werden, um physiologische oder chemische Parameter detektieren zu können. [36] [37] Charakteristika wie Zellgröße und Granularität werden durch Fokussierung des Anregungslichtes in verschiedenen Winkeln auf die Einzelzelle erfasst, so kann die Zellgröße durch Bestimmung des FSC im flachen Winkel ( $0,5^\circ$  -  $5^\circ$ ) detektiert werden. Im Gegensatz dazu wird die Granularität im großen Winkel zwischen Laser und Zelle ( $90^\circ$ ) erfasst, dabei wird das SSC gemessen. [36] [37] Wurden die Zellen zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so werden diese mit der Wellenlänge der entsprechend vorhandenen Laser angeregt. Hierbei werden Photonen durch die Fluorophore der Farbstoffe aufgenommen. Um die Fluoreszenzsignale der verschiedenen Farbstoffe zu trennen, erfolgt der Einsatz von dichroitischen Spiegeln (Farbteilerspigel) und Spektralfiltern (Lang -, Kurz - und Bandpassfilter). [36] Die emittierten Photonen werden rechtwinklig zur Laserachse durch Photomultiplier erfasst, verstärkt und in elektrische Signale konvertiert. [36] [37] Daraufhin werden diese Daten der Software zur Datenauswertung übergeben.

## 1.6 Proteomanalyse mittels LC - MS

Durch eine Analyse auf Proteinebene können detaillierte Einblicke in die genetischen, metabolischen und physiologischen Eigenschaften der Organismen gewonnen werden. [31] Für eine quantitative Analyse des Proteoms und insbesondere der Hyp1 - Expression der beiden Stämme *putA\_pEKE-hyp1* und *pEKE-hyp1* kam eine Kopplung aus LC und MS zum Einsatz. Neben der hohen Sensitivität liegt ein weiterer Vorteil in der Möglichkeit einer Automatisierung durch die online Kopplung der LC - ESI - MS. [39] Allgemein besteht ein MS aus einer Ionenquelle, dem Massenanalysator und schließlich dem Detektor. [40]

Vor der chromatographischen Trennung werden die Proteine durch Proteasespaltung (z. B. Trypsin) in die einzelnen Peptide zerlegt, da diese weniger heterogene Eigenschaften besitzen als die gesamten Proteine. [41] So werden die Peptidgemische in der LC nach den jeweiligen physikalischen Eigenschaften wie Ladung und Hydrophobizität getrennt, um auch weniger abundante Peptide detektieren zu können. [31] [42] Hierbei wird in den meisten Fällen eine Kombination von Ionenaustausch - und RP - Chromatographie eingesetzt. [42] Nach dieser Vorseparierung der Peptide in bestimmte Fraktionen gelangen diese mittels der ESI in das MS. [43] [44] [45] Im Rahmen dieser Arbeit kam eine Kombination aus linearer Ionenfalle und dem Orbitrap - Analysator zum Einsatz. Zunächst kommt es in der linearen Ionenfalle zur Akkumulation der Ionen, die einerseits durch einen Quadrupol - und andererseits durch ein elektrisches Feld begrenzt werden. [44] Im Anschluss an einige Reaktionen innerhalb der Ionenfalle werden die Ionen in der

Orbitrap durch ein oszillierendes elektrisches Feld gefangen, aus dem sie nach einem bestimmten Intervall zur MS bzw. MS/MS Analyse übergeben werden. [44] Die Identifizierung erfolgt nun durch den Vergleich der ermittelten Molekularmassen mit den Sequenzen von Genom - oder Proteindatenbankeinträgen.

## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Kombination aus flowzytometrischen Messungen und einer Proteomanalyse die Expression von Hyp1 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen auf Populations -, sowie Subpopulationsebene, zu untersuchen.

Mittels LC - MS basierten Messungen sollte die Hyp1 - Expression des Stammes *putA\_pEKE-hyp1* auf Populationsebene überprüft werden. Anhand der LC - MS Daten sollte eine Quantifizierung des rekombinanten Proteins in Abhängigkeit von äußeren Parametern wie der Kultivierungszeit verfolgt werden.

Außerdem wurden die flowzytometrisch detektierten Subpopulationen innerhalb der beiden *hyp1* - tragenden Stämme separiert. Diese sollten ebenfalls in Hinsicht auf die Hyp1 - Quantität mittels einer LC - MS Analyse charakterisiert werden.

Neben der Analyse der Hyp1 - Expression sollten weitere Proteine des Proteoms der beiden Stämme *putA\_pEKE-hyp1* und *pEKE-hyp1* für eine Quantifizierung und Charakterisierung von auftretenden Subpopulationen herangezogen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Stämme:

- *putA\_pEKE-hyp1* und *pEKE-hyp1* (TU Dortmund, Fakultät Bio - und Chemieingenieurwesen, Chemische Biotechnologie)

#### Chemikalien:

- Glycerin (Merck, Darmstadt)
- LB - Medium (Lennox, Carl Roth, Karlsruhe)
- Agar (Difco, Lawrence USA)
- $\text{NaN}_3$  (Carl - Roth, Karlsruhe)
- Na - PBS: 8,4 % (v/v) Lösung A: 98 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - Lösung (Sigma - Aldrich, München)  
1,6 % (v/v) Lösung B: 116 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - Lösung (Sigma - Aldrich, München)

#### Geräte:

- Brutschrank (Mettler, Deutschland)
- Inkubator: TH30 (Edmund Bühler, Hechingen)  
SM30 (Edmund Bühler, Hechingen)
- Photometer: Ultrospec III (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nümbrecht)

### Kultivierung:

Sofern nicht anders erwähnt, werden die wässrigen Lösungen mit sterilem Aqua dest. aufgefüllt.

Komponente	VK3 und HK (+/+)	VK1 - 3 und HK (-/-)
M9 - Salzlösung *	20 % (v/v)	20 % (v/v)
Glukose <sup>1</sup> (50 g/l)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
1M MgSO <sub>4</sub> <sup>1</sup> - Lösung	0,2 % (v/v)	0,2 % (v/v)
Spurenelemente - Lösung (USBB) **	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Thiamin <sup>2</sup> (10 g/l)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Kanamycin <sup>1</sup> (50 mg/ml)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Prolin <sup>2</sup> (23 g/l)	10 % (v/v)	
IPTG <sup>2</sup> (60 g/l)	0,4 % (v/v)	

<sup>1</sup> Carl - Roth, Karlsruhe; <sup>2</sup> Sigma - Aldrich, München

#### \* M9 - Salzlösung

Komponente	Konzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	42,5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2</sup>	15 g/l
NH <sub>4</sub> Cl <sup>2</sup>	2,5 g/l

<sup>1</sup> Merck, Darmstadt; <sup>2</sup> Carl - Roth, Karlsruhe

#### \*\* USBB - Salze

Komponente	Konzentration
HCl <sup>1</sup>	1 M
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>	1,5 g/l
ZnSO <sub>4</sub> <sup>1</sup>	1,05 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>1</sup>	0,3 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O <sup>4</sup>	0,25 g/l
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	0,35 g/l
Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	0,84 g/l
CaCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	4,12 g/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	4,87 g/l

<sup>1</sup> Carl - Roth, Karlsruhe; <sup>2</sup> Ferak Berlin GmbH, Berlin;

<sup>3</sup> Merck, Darmstadt; <sup>4</sup> Chemapol, Prag



### DAPI - Färbung:

Falls nicht anders erwähnt, werden alle wässrigen Lösungen mit Aqua bidest. aufgefüllt.

#### **Stock A**

Zitronensäure <sup>1</sup> 0,1 M

Tween20 <sup>2</sup> 4 mM

#### **Stock B**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> <sup>3</sup> 0,4 M

Stammlösung DAPI (**Stock C**) 0,68 µM

#### **Stock C**

DAPI <sup>2</sup> 143 µM

Difo <sup>4</sup> 1 % (v/v)

<sup>1</sup> Carl - Roth, Karlsruhe; <sup>2</sup> Sigma - Aldrich, München; <sup>3</sup> Isocommerz, Dresden;

<sup>4</sup> Honeywell Riedel - de Haën, Seelze

#### **Geräte:**

- Zentrifuge: Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg)

### DiOC<sub>6</sub>(3) - Färbung:

Falls nicht anders erwähnt, werden alle wässrigen Lösungen mit Aqua bidest. aufgefüllt.

<b>Komponente</b>	<b>Volumina</b>
-------------------	-----------------

DiOC <sub>6</sub> (3) <sup>1</sup>	50 µM
------------------------------------	-------

Difo <sup>2</sup>	4,8 % (v/v)
-------------------	-------------

99,5 % Ethanol <sup>3</sup>	95,2 % (v/v)
-----------------------------	--------------

<sup>1</sup> Sigma - Aldrich, München; <sup>2</sup> Honeywell Riedel - de Haën, Seelze;

<sup>3</sup> Carl - Roth, Karlsruhe

- Imidazolpuffer (Merck, Darmstadt): 1,36 g/l, pH 7 (pH - Meter 766 Calimatic Knick, Berlin)

### **Flowzytometrische Messungen:**

- MoFlo<sup>®</sup> (Beckman Coulter (ehemals Dako Cytomation), USA)
- Argon - Ion - Laser:
  - Innova 70 ( $\lambda = 488\text{nm}$ , Leistung: 400 mW)
  - Innova 90C (Multiline UV:  $\lambda = 330 - 360\text{ nm}$ , Leistung: 100 mW)

(Coherent,  
Santa Clara, CA)
- Beads zur Justierung:
  - 1  $\mu\text{m}$  FluoSpheres<sup>®</sup> blue - fluorescent
  - 2  $\mu\text{m}$  FluoSpheres<sup>®</sup> yellow - green (YG) - fluorescent

(Molecular Probes, Eugene,  
Oregon USA)
- Beads zur Überprüfung Fluoreszenzsignale:
  - 0,5  $\mu\text{m}$  Fluoresbrite<sup>™</sup> Bright Blue (BB) Carboxylate Microspheres (Polysciences Inc.,  
Eppelheim, Deutschland)
  - 1  $\mu\text{m}$  FluoSpheres<sup>®</sup> YG - fluorescent (Molecular Probes, Eugene, Oregon USA)
- Software: SUMMIT<sup>®</sup> v4.3 (Cytomation, USA)

### **Fluoreszenzmikroskopie:**

- Carl - ZEISS Axioskop (Göttingen, Deutschland)
- Bildanalyse: Sony Farbkamera 3 - CCD (Zaventem, Belgien)
- Software: Openlab 3.1.4. (Improvision, Lexington, Massachusetts, USA)

### **Proteommessungen:**

#### **Chemikalien:**

- MeOH (Merck, Darmstadt)
- Ammoniumbicarbonat (Sigma - Aldrich, München)
- Acetonitril (Th. Geyer, chemsolute<sup>®</sup>, Renningen)
- Ameisensäure (Merck, Darmstadt)

- Trypsin: 0,1 µg/µl (Promega, Mannheim)

#### **Geräte:**

- Vakuumzentrifuge: Univapo 100H (UniEquip, Martinsried); Unijet II (UniEquip, Martinsried)
- Vakuumpumpe: N 022 AN. 18 (KNF Neuberger, Freiburg)

Aufsatz für 96 Well - Platte (Merck Millipore GmbH, Schwalbach)

- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5418 (Eppendorf, Hamburg)
- LC - MS: nanoAcquity UPLC (Waters, Milford, Massachusetts, USA)

- Sammelsäule: 180 µm x 2 cm x 5 µm

- Trennsäule: 75 µm x 15 cm, 1.75 µm

nano - HPLC System (nanoAcquity, Waters, Milford, Massachusetts, USA)

LTQ Orbitrap XL (ThermoScientific, Dreieich)

#### **sonstige Materialien:**

- MultiScreen<sup>TM</sup><sub>HTS</sub> 96 - Well Filtration Plate, Hydrophilic Low Protein Binding, Durapore<sup>®</sup> Membrane, 0,2 µm (Merck Millipore GmbH, Schwalbach)
- ZipTip<sup>®</sup> Pipette Tips (ZTC18S096, Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA)
- Pierce<sup>®</sup> Peptide Retention Time Calibration Mixture (ThermoScientific, Dreieich)

#### **Software:**

- *Mascot*: [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com), verfügbar August 2011
- *MaxQuant* Version 1.2.0.18: <http://maxquant.org/>, verfügbar August 2011
- *DAVID Bioinformatics Resources* 6.7 [46] [47], verfügbar August 2011

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte in LB - Medium unter Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin. Die Suspensionen wurden 1:1 mit 50 %igen (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert. Alle vier Wochen wurden die beiden Stämme erneut auf LB - Agarplatten (1,8 % w/v) mit 50 µg/ml Kanamycin überimpft. Daraufhin erfolgte eine ein - bis zweitägige Inkubation bei 30 °C und anschließender Lagerung im Kühlschrank.

### 2.2.2 Kultivierung und Fixierung

Die Kultivierung der Stämme *putA\_pEKE-hyp1* sowie *pEKE-hyp1* erfolgte jeweils über vier Schritte, d. h. es wurden drei aufeinanderfolgende VK (VK1, VK2, VK3) und eine anschließende HK je Stamm angesetzt. Zum Animpfen von 20 ml VK1 - Medium diente eine Kolonie von einer frisch bewachsenen Agarplatte. Diese Suspensionen wurden bei 30 °C und 175 U/min für mindestens 24 h geschüttelt. Anschließend wurden etwa 2 ml dieser Suspension als Inokulum für 20 ml VK2 - Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte analog zu VK1. Nun wurden zwei VK3 - Medien vorbereitet, d. h. einerseits wurden IPTG und Prolin (+/+) zugegeben während in der Kontrolle (-/-) diese beiden Zusätze nicht appliziert worden sind. Diese Medien wurden dann mit den entsprechenden Volumina der VK2 so beimpft, dass eine  $OD_{600} = 0,05$  ( $d_{Küvette} = 0,5$  cm) erreicht wurde. Die Inkubation von VK3 erfolgte unter gleichen Bedingungen wie VK1 und VK2. Schließlich wurden aus den (-/-) - und (+/+) - Ansätzen der VK3 je 200 ml HK - Medium der entsprechenden Induktionsvariante angeimpft, wobei wiederum eine  $OD_{600}$  von 0,05 ( $d_{Küvette} = 0,5$  cm) zu erreichen galt. Diese Batch - Kulturen in (-/-) - und (+/+) - Induktion je Stamm wurden bei 30 °C und 210 U/min inkubiert. Hierbei erfolgte eine stündliche (ab der exponentiellen Phase: zweistündliche) Probenahme mit Messung der  $OD_{600}$  und gleichzeitiger  $NaN_3$  - Fixierung. Durch eine Behandlung der Zellen mit 10 %iger  $NaN_3$  - Lösung wird eine Fixierung des jeweiligen Zellzykluszustands erreicht. Dadurch konnten die Proben über längere Zeit im Kühlschrank gelagert werden.

### 2.2.3 DNA - Färbung mittels DAPI

Die entnommenen Volumina der in 10 %iger  $NaN_3$  - Lösung fixierten Zellen richtete sich nach der entsprechenden OD der Suspension. So wurden zwischen 250 µl und 1 ml der fixierten Probe für die weitere Färbeprozedur verwendet. Zum Waschen der Zellen erfolgte die Zugabe von 2 ml Na -

PBS mit anschließender Zentrifugation bei 3214\*g für 5 min. Die Überstände wurden verworfen und jede Probe wurde mit Na - PBS auf eine Konzentration von etwa  $3 \cdot 10^8$  Zellen/ml eingestellt ( $OD_{700}$  von 0,035 mit  $d_{Küvette} = 0,5$  cm). Für die anschließende Zentrifugation bei 3214\*g für 5 min dienten 2 ml dieser Zellsuspensionen. Die Pellets wurden je in 1ml Stock A resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen schloss sich das Lösen der Pellets in 2 ml 0,68  $\mu$ M Stock B an. Nach einer Inkubationszeit von etwa 3 h konnten die gefärbten Proben flowzytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

## 2.2.4 Bestimmung des Membranpotentials

Die Zellmembran des Stammes *putA\_pEKE-hyp1* wurde mit dem Farbstoff DiOC<sub>6</sub>(3) angefärbt, um den Energiestatus der Zellen zu visualisieren. Hierfür erfolgte die Kultivierung der Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben. Zur Erfassung des Membranpotentials wurden unfixierte Zellen nach etwa 7 - 9 h Wachstum verwendet, sodass diese aus der (früh -) exponentiellen Phase stammten. So schloss sich die Zellernte an, indem zunächst die Zentrifugation bei 3214\*g für 5 min erfolgte. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml 20 mM Imidazolpuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Das Pellet wurde erneut in Imidazolpuffer aufgenommen und eine  $OD_{600}$  von 0,035 ( $d_{Küvette} = 0,5$  cm) eingestellt. Anschließend musste in möglichst kurzem zeitlichem Abstand eine Färbung der Zellen erfolgen, um weder eine Änderung bzw. einen Verlust des Membranpotentials hervorzurufen.

Um die optimale Konzentration des Farbstoffs DiOC<sub>6</sub>(3) zu ermitteln, wurden die Zellen verschiedenen DiOC<sub>6</sub>(3) - Konzentrationen (10 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM; 150 nM; 200 nM; 250 nM; 350 nM; 500 nM) ausgesetzt. Die Inkubation betrug jeweils 10 min auf Eis. Weiterhin sollte die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes ( $c_{End} = 50$  nM) in Abhängigkeit der Inkubationszeit getestet (2,5 min; 5 min; 7,5 min; 10 min; 15 min; 20 min; 30 min; 40 min; 50 min; 60 min) werden.

Außerdem sollte mit Hilfe von CCCP und Valinomycin die Membranpotentialfärbung validiert werden. Dazu erfolgte der Einsatz verschiedener Konzentrationen dieser Substanzen (siehe Tabelle 2) bei einer Farbstoffkonzentration von 50 nM.

**Tabelle 2: Konzentrationen und Inkubationszeiten von CCCP und Valinomycin**

Substanz	CCCP	Valinomycin
Konzentration [ $\mu$ M]	0; 15; 30; 50; 100	0; 10; 20; 50; 100
Inkubationszeit [min]	30	3

Zunächst wurden den Zellen die entsprechenden Volumina der jeweiligen Substanz zugesetzt und bei RT inkubiert (Inkubationszeit siehe Tabelle 2). Anschließend erfolgte die Zugabe des Farbstoffes DiOC<sub>6</sub>(3) mit einer c<sub>End</sub> von 50 nM für 10 min bei RT.

Als Negativkontrolle dienten Ethanol - fixierte Zellen, die einer Doppelfärbung mittels DiOC<sub>6</sub>(3) und PI unterzogen wurden. Hierbei erfolgte zunächst das Zentrifugieren von 1 ml eingestellter Imidazolzellen (OD<sub>600</sub> = 0,035) bei 3214\*g für 5 min, mit anschließender Resuspension des Pellets in 1 ml 70 %igem Ethanol (v/v) für etwa 15 min. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen und einer Aufnahme des Pellets in 1 ml Imidazolpuffer schloss sich die Zugabe von PI (c<sub>End</sub> = 0,5 µM) mit einer Inkubationszeit von 10 min an. Anschließend erfolgte die Färbung mit DiOC<sub>6</sub>(3) (c<sub>End</sub> = 50 nM) für 10 min.

Die Proben konnten nun einer flowzytometrischen bzw. fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen werden (siehe 2.2.5). Für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurden die Suspensionen für 5 min bei 3214\*g abzentrifugiert.

## 2.2.5 Flowzytometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Für eine Analyse der Streulicht - und Fluoreszenzsignale erfolgte die Messung von 50.000 - 60.000 Ereignissen. Getriggert wurde über das SSC, d. h. alle Ereignisse mit einem SSC wurden erfasst. Zu Beginn der Messungen wurde das MoFlo® mittels Beads zweier Größen und Fluoreszenzen in Hinblick auf die Fluoreszenzsignale justiert. Außerdem kam der mit 0,24 µM - DAPI gefärbte interne Zellstandard *Acinetobacter calcoaceticus* zur Kalibrierung der Einstellungen zum Einsatz. Bei einigen Proben erfolgte das Zumischen von Beads, um die Lage der Fluoreszenzsignale im Dotplot überprüfen zu können. Hierbei kamen bei der DAPI - Färbung die BB - Microspheres und bei der DiOC<sub>6</sub>(3) - Messung die YG - fluorescent zum Einsatz. In Tabelle 3 sind die Daten zur Erfassung von FSC - und SSC - Signal, sowie DAPI - und DiOC<sub>6</sub>(3) - Fluoreszenz zusammengefasst.

**Tabelle 3: Daten zur Erfassung der gemessenen Parameter**

Parameter	λ Anregung	λ Emission
<b>FSC - Signal</b>	488 nm	488 nm - Filter: 488/10
<b>SSC - Signal</b>	488 nm	488 nm - Filter: 488/10
<b>DAPI - Fluoreszenz (MLUV)</b>	330 - 360 nm	480 nm - Filter: 450/65
<b>DiOC<sub>6</sub>(3) - Fluoreszenz</b>	488 nm	497 nm - Filter: 530/40

Parallel zu den flowzytometrischen Messungen wurden die gefärbten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie in Bezug auf die Färbequalität und die morphologischen Eigenschaften untersucht.

Um die detektierten Subpopulationen in den beiden Stämmen zu separieren, erfolgte der Einsatz der „four - way - option“ im Modus „single cell one“. Damit konnten gleichzeitig vier Subpopulationen anhand von FSC -, SSC - und FL4 - Signalen sortiert werden. Die Sortiergeschwindigkeit lag bei 2000 Ereignissen/Sekunde, wobei eine Endzellzahl von etwa  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro Gate zu erreichen galt. Die sortierten Zellen wurden sofort auf eine Membran der 96 - Well - Platte filtriert.

## **2.2.6 LC - MS Analyse der beiden *hyp1* - tragenden Stämme**

Das Protokoll der Kombination einer flowzytometrischen Sortierung von Subpopulationen und anschließender Proteomanalyse wurde gemäß [48] übernommen.

### **2.2.6.1 Membranfiltration**

Für die Membranfiltration dienten nach 2.2.2 kultivierte und fixierte Zellen (höchstens 24 h). Die Zellzahl der sortierten Proben konnte im Flowzytometer exakt bestimmt werden, sodass folgende Berechnung ausschließlich bei den Proben für das Gesamtproteom (siehe 3.3.1.1) erforderlich war. Je nach OD der Proben wurden die entsprechenden Volumina entnommen, sodass etwa  $10^6$  -  $10^7$  Zellen zur Verwendung standen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anhand der ermittelten OD, wobei dies keine genaue Methode zur Quantifizierung der Zellen ist. So fand unter der Annahme, dass  $6 \cdot 10^7$  Zellen/ml bei einer  $OD_{600}$  von 0,035 in der Suspension seien, eine Umrechnung für die entsprechende OD statt. (Eine Zellzahl von  $6 \cdot 10^7$  Zellen/ml wurde zuvor für eine Zellsuspension ( $OD_{600} = 0,035$ ) der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt.)

Zunächst erfolgte das Waschen der Membranen der 96 - Well - Platten mit jeweils 100  $\mu$ l Na - PBS. Die Flüssigkeit wurde bei 10 - max. 15 mmHg abgesaugt, bis keine Rückstände mehr zu erkennen waren. Anschließend wurden die Proben in die Wells pipettiert und unter gleichen Bedingungen filtriert. Bei den unsortierten Proben (Gesamtproben) mussten einheitliche Ausgangsvolumina durch Na - PBS Zugabe hergestellt werden. Nun schloss sich Waschen der Membranen mit je 250  $\mu$ l Na - PBS an, wobei das Absaugen erneut bei maximal 15 mmHg erfolgte. Schließlich wurden die Membranen vorsichtig ausgeschnitten, zerkleinert (ca. vierteln) und in Polypropylen - Tubes ggf. bei -20 °C gelagert oder sofort weiter behandelt (s. 2.2.6.2).

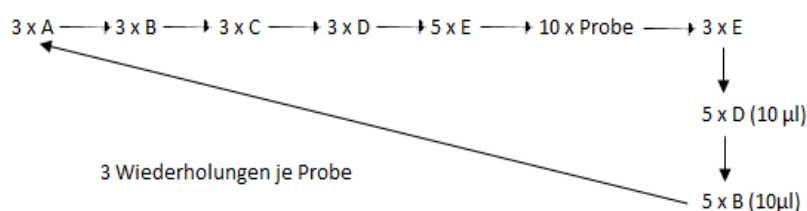
### 2.2.6.2 Verdau nach Membranfiltration

Zu den zerkleinerten Membranen wurden nun jeweils 25 µl 20 mM Ammoniumbicarbonat - Puffer gegeben, sodass alle Membranstücke vollständig bedeckt waren. Nun erfolgte die Zugabe von je 1 µl Acetonitril und 5 µl Trypsin mit anschließendem Mischen der Bestandteile. Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um den Trypsinverdau zu stoppen, erfolgte die Zugabe von Ameisensäure mit einer  $c_{\text{End}}$  von 0,1 % (v/v). Es schloss sich die Inkubation für 5 min bei 37 °C und 1400 rpm an. Durch eine darauf folgende Zentrifugation bei 13.000\*g für 10 min sollten Zellreste, sowie Membranstücke, eliminiert werden. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt. Nun konnten die Proben entweder bei -20 °C gelagert oder sofort weiter mit dem Zip Tip Protokoll bearbeitet werden, in dem eine Aufreinigung und Entsalzung der Peptide erfolgt. In Tabelle 4 sind die dafür benötigten Lösungen zusammengestellt – zur Herstellung der Lösungen wurde Aqua bidest. benutzt. Für jede Probe wurden jeweils 10 µl der Lösung B und D in separate Tubes überführt.

**Tabelle 4: Lösungen für Zip Tip Protokoll**

Lösung	Zusammensetzung
A (Äquilibration)	100 % Acetonitril
B	80 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure
C	50 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure
D	30 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure
E (Waschlösung)	0,1 % Ameisensäure

Zunächst wurde durch dreimaliges Aufziehen in Lösung A die  $C_{18}$  - Matrix der Zip Tip Pipettenspitze äquilibriert. Es schloss sich in folgender Reihenfolge ein dreimaliges Spülen in Lösung B, C und D an. Nun erfolgte in Lösung E ein fünfmaliges Aufziehen. Nun konnten die Peptide durch eine zehnmale Aufnahme von 10 µl der Probe gebunden werden, mit anschließendem Waschen in Lösung E durch dreimaliges Aufziehen. Die an der  $C_{18}$  - Matrix gebundenen Peptide wurden nun durch fünfmaliges Spülen in jeweils 10 µl der Lösung D und B eluiert. Diese Schritte wurden für jede Probe dreimal wiederholt (s. Abb. 2).



**Abbildung 2: Schema Zip Tip Protokoll**



Die Elutionen von D und B mit einem jeweiligen Volumen von 10 µl wurden vereinigt und mittels Vakuumzentrifugation getrocknet. Diese Proben wurden bei -20 °C gelagert. Vor der LC - MS Messung erfolgte die Aufnahme der Proben in 15 µl (20 µl für sortierte Proben) 0,1 % (v/v) Ameisensäure mit anschließender Inkubation bei 20 °C für 10 min und 1400 rpm. Daraufhin schloss sich eine Behandlung für 30 Sekunden im Ultraschallbad an. Schließlich wurden die Proben in Glasvials überführt.

#### **2.2.6.3 LC - MS Messung**

Zunächst wurden die vorbereiteten Peptidgemische (siehe 2.2.6.2) in der LC aufgetrennt, bevor sich eine massenspektrometrische Analyse anschloss. So wurden je 9 µl Probe auf einer mit C<sub>18</sub> - Material gepackten Sammelsäule aufkonzentriert. Dieser Vorgang erfolgte mit einer mobilen Phase aus 0,1 % (v/v) Ameisensäure und einer Flussrate von 15 µl/min für 8 min. Anschließend wurden die Peptide auf die Trennsäule eluiert. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine mobile Phase aus 0,1 % (v/v) Ameisensäure und einem variierenden Salzgradienten von 6 - 40 % (v/v) Acetonitril für 90 min. Durch eine steigende Konzentration an Acetonitril wurden die Peptide von der Trennsäule eluiert und gelangten über eine ESI - Quelle in das Massenspektrometer. Die Peptidionen wurden zwischen 400 Da und 1400 Da gescannt, sodass eine MS - Spektren Erstellung erfolgte. Eine automatische Fragmentierung mittels CID der Peptidionen fand bei einer Intensitätsüberschreitung von 3000 statt, in etwa 1 msec entstanden sechs MS/MS - Spektren.

#### **2.2.6.4 Auswertung der massenspektrometrischen Daten**

Um die LC - MS - Daten auszuwerten, erfolgte zunächst eine Datenbanksuche mit der Software *Mascot*, auf Grundlage der NCBI nr - Einträge. Um nun die praktisch ermittelten Massen einem Peptid zuordnen zu können, erfolgt ein Vergleich dieser mit den theoretisch berechneten Massen anhand genomischer Datenbankeinträge aller Bakterien. Anhand des sogenannten *MOWSE Scoring Algorithmus* werden den ermittelten Peptiden *Scores* zugeordnet. Besitzt das gefundene Peptid einen hohen *Score*, so liegt eine geringe Wahrscheinlichkeit für ein zufälliges Ergebnis vor. [49] Als Qualitätsfilter wurde der *Mascot significant threshold* von 0,5 gewählt und eine Identifizierung von mindestens zwei Peptiden pro Protein vorausgesetzt.

Die Software *MaxQuant* wurde für eine markierungsfreie Quantifizierung der Proteine verwendet. [50] Die Quantifizierung beruht auf einer Berechnung der Massenintensitäten der Peptide in Relation zur Peptidanzahl und Fragmentierungshäufigkeit pro Protein. Hierfür wird eine spezifische

Sequenzdatenbank benötigt. Da das Genom des verwendeten *E. coli* - Stammes BW25113 noch nicht sequenziert in einer Datenbank vorliegt, wurde wie folgt vorgegangen. Die Genomsequenzen der durch den erhaltenen *Mascot* - Datensatz fünf ähnlichsten *E. coli* - Stämme (höchste Proteinwahrscheinlichkeiten) wurden als eine Sequenzbibliothek angelegt (Tabelle 5) und mit der Sequenz von Hyp1 ergänzt.

**Tabelle 5: *E. coli* - Stämme für *MaxQuant***

<b><i>E. coli</i></b>	O157:H7 (EDL933)	K - 12_MG 1655	OP50	536	HS
-----------------------	------------------	----------------	------	-----	----

Ein großer Vorteil dieser Software ist, dass mehrere Proben zu einem Experiment zusammengefasst werden können, sodass die Peptididentifizierung probenübergreifend erfolgt. Als Qualitätsmaß wurden mindestens zwei Peptide (*unique*) pro Protein angegeben und eine *false discovery rate* von 1 %. Die resultierenden Daten der Software wurden, wie unter Anlagen (Teil 2) beschrieben, normalisiert und wie folgt ausgewertet. Verunreinigungen wie Trypsin und Keratin werden nicht betrachtet.

Für eine funktionelle Gruppierung aller detektierten Proteine dieser Proben erfolgte der Einsatz der Datenbank *DAVID*, indem die aus *MaxQuant* resultierenden gi -Nummern in Form einer Liste (Listentyp: *GeneList*) eingegeben wurden. Als Bezeichnung wurde „*Protein\_GI\_Accession*“ gewählt. Für ein funktionelles Clustering der Proteine erfolgte der Einsatz der „*SP\_PIR\_Keywords*“ - Kategorie.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Wachstumsverhalten des Expressionsstammes *putA\_pEKE-hyp1*

Für eine DAPI - Färbung und Proteomanalyse wurden zwei separate HK kultiviert, deren Wachstumsverläufe in Abb. 3 dargestellt sind. Die einzelnen HK sind aufsteigend nummeriert und werden im weiteren Text analog benannt (HK1, HK2).

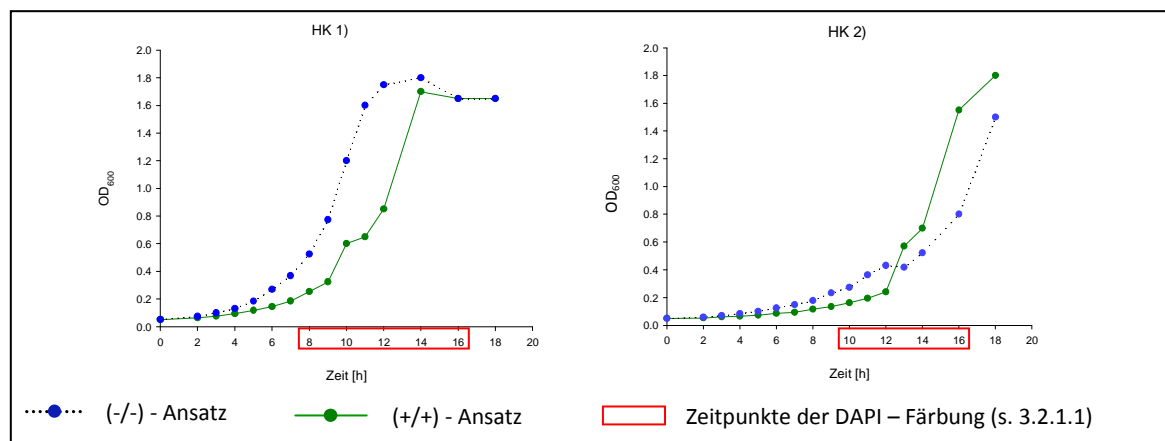


Abbildung 3: Wachstumskurven 1) und 2) des Stammes *putA\_pEKE-hyp1*

Die Kultivierung der *Batch* - Ansätze HK1 und HK2 umfasste 18 h. In den beiden Diagrammen sind jeweils zwei Kurven dargestellt. Zu erkennen sind ähnliche Trends der (+/+) - Kultur, d. h. nach einem zunächst verzögerten Wachstum gegenüber der Kontrolle, steigt die OD über die bzw. auf das gleiche Level des (-/-) - Ansatzes. Jedoch lassen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den beiden HK feststellen. So ist zu erkennen, dass die zwei Induktionsansätze der HK2 eine längere Anlaufphase aufweisen, als die der HK1. Weiterhin ist ersichtlich, dass der (+/+) - Ansatz in HK2 nach etwa 12 h eine deutlich höhere OD aufweist, als der (-/-) - Ansatz. In HK1 hingegen besitzt der (-/-) - Ansatz im gesamten abgebildeten Zeitfenster eine höhere (bzw. gleiche) OD.

Zu erkennen ist die Tatsache, dass sich das Wachstum der beiden HK unterscheidet, obwohl eine lange und stabile Vorkultivierung erfolgte. Dies könnte in einer Instabilität des GVO begründet liegen, was jedoch für einen Biotransformationsprozess im industriellen Maßstab unvorteilhaft ist, da keine genauen Prognosen über Wachstum und Ausbeute getroffen werden können.

## 3.2 Flowzytometrische Messungen

In den flowzytometrischen Analysen wurden die Zellgröße über das FSC und die Granularität über das SSC gemessen. Der DNA - Gehalt wurde mittels der Fluoreszenzintensität des spezifisch an Adenin/Thymin - reichen Sequenzabschnitte bindenden Farbstoffs DAPI über FL4 und das Membranpotential über FL1 detektiert. Die Darstellung der Messdaten erfolgte einerseits in Histogrammen und andererseits in Dotplots. Um die sich verändernden DNA - Gehalte im Laufe des Wachstums darzustellen, wurde die einparametrische Darstellung von FL4 mit Gatesetzung gewählt (s. Abb. 4).

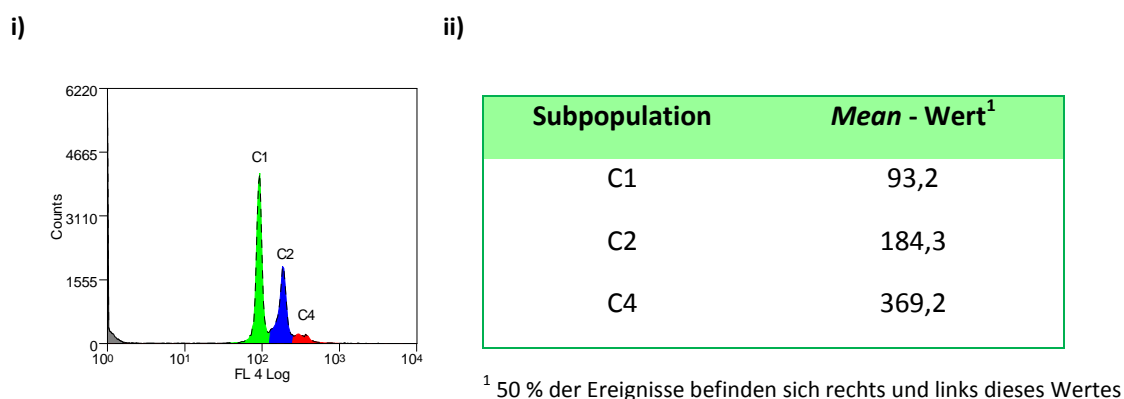


Abbildung 4: DNA - Verteilung (i) mit entsprechenden Mean - Werten (ii)

Die *Mean* - Werte der einzelnen Subpopulationen sollen exemplarisch den linearen Zusammenhang zwischen den einzelnen Chromosomenäquivalenten zeigen (s. Abb. 4). Hierbei wurde die Bezeichnungen  $C_x$  gewählt, wobei C für das Chromosomenäquivalent und x für die Anzahl dessen steht.

Neben der erwähnten einparametrischen Darstellung der DAPI - Fluoreszenzsignale erfolgte weiterhin die Abbildung der FL4 - Daten in Abhängigkeit des FSC in Form von Dotplots. Ebenfalls wurden FL1 und FSC, sowie SSC und FSC in einer solchen zweiparametrischen Auftragung dargestellt.

### 3.2.1 Flowzytometrische Untersuchung des Stammes *putA\_pEKE-hyp1*

Der Expressionsstamm *putA\_pEKE-hyp1* wurde in beiden Induktionsansätzen flowzytometrisch untersucht, um einen eventuellen Einfluss der Induktion bzw. Proteinexpression auf physiologische Charakteristika erkennen zu können. Hierzu wurde in *Batch* - Ansätzen kultiviert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt wurden.

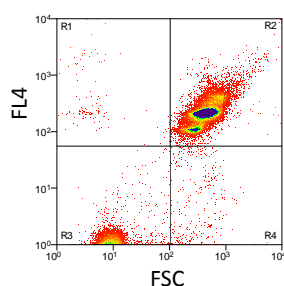
### 3.2.1.1 DAPI - Färbung

Um die DNA - Verteilung in den Kulturen zu beurteilen, erfolgte deren Färbung mittels DAPI. In Tabelle 6 sind die Zeitpunkte der Probenahme für die einzelnen beiden HK zusammengestellt.

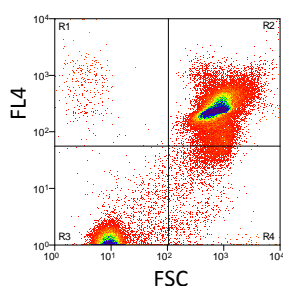
**Tabelle 6: Probenahme für die DAPI - Färbung**

	HK1	HK2
t [h]	9, 10, 11, 12, 14, 16	10, 11, 12, 13, 14, 16
Ansätze	(-/-) und (+/+)	

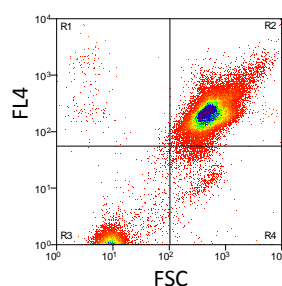
In den Abbildungen 5 - 8 sind FL4 und FSC in Form von Dotplots gegeneinander aufgetragen, um die *Batch* - Ansätze in Hinblick auf DNA - Gehalt und Zellgröße zu vergleichen.



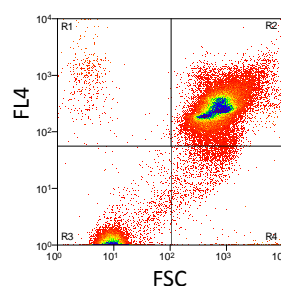
**Abbildung 5: (-/-) - Ansatz  
HK1, t = 14 h**



**Abbildung 6: (+/+) - Ansatz  
HK1, t = 14 h**



**Abbildung 7: (-/-) - Ansatz  
HK2, t = 14 h**



**Abbildung 8: (+/+) - Ansatz  
HK2, t = 14 h**

Zunächst lässt sich in den vorangegangenen Abbildungen feststellen, dass kleine Zellen weniger DNA besitzen, als größere Zellen. Außerdem sind die Zellen der (-/-) - Ansätze kleiner, als die der (+/+) - Ansätze. Ebenfalls zeigen sich geringfügig höhere DNA - Gehalte in den induzierten Ansätzen. Die Lage der Verteilung hängt jedoch maßgeblich von der Wachstumsphase der Zellen ab, wie im folgenden Text erläutert wird. Durch einen Vergleich der Dotplots sollte gezeigt werden, dass trotz langer Vorkultivierung eine gewisse Unstetigkeit vorherrscht. Betrachtet man die (-/-) - Ansätze der beiden HK, so lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. In Abb. 5 sind drei Subpopulationen zu verzeichnen, wohingegen dies in Abb. 7 nicht der Fall ist. So zeigt der (-/-) - Ansatz der HK2 eine für das exponentielle Wachstum charakteristische DNA - Verteilung. Im Gegensatz dazu weisen die Subpopulationen in Abb. 5 stark auf das Erreichen der stationären Phase hin. Dies bedeutet nun, dass sich der (-/-) - Ansatz der HK2 nach 14 h Wachstum noch in der exponentiellen Phase befindet, wohingegen die Kontrolle der HK1 schon die stationäre Phase erreicht hat. Schließlich zeigen die (+/+) - Ansätze der HK1 und HK2 (Abb. 6 und 8) eine hohe Ähnlichkeit in Bezug auf die DNA - Verteilung und Zellgröße. Die Ereignisse in den beiden unteren Quadranten der Abbildungen 5 - 8

sind womöglich Zellen, die im Laufe der Färbeprozedur zerstört wurden. In den Anlagen (Teil 1) sind die flowzytometrischen Daten der DAPI - Färbung zusammengefasst.

Parallel zu den flowzytometrischen Messungen wurden die gefärbten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 9) bezüglich Färbequalität und morphologischer Eigenschaften betrachtet. Dabei konnten die Messdaten der Flowzytometrie bestätigt und eine optimale Färbung festgestellt werden.

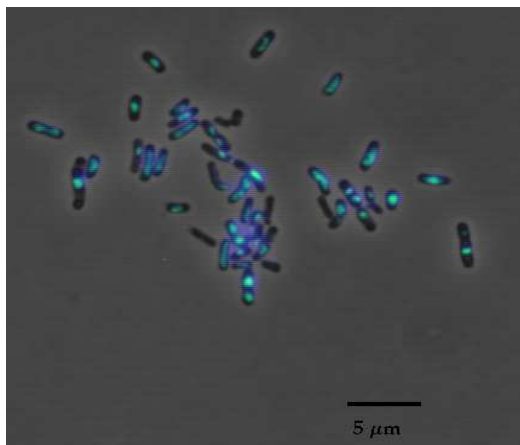


Abbildung 9: (-/-) - Ansatz HK2, t = 14 h

### 3.2.1.2 Morphologische Eigenschaften

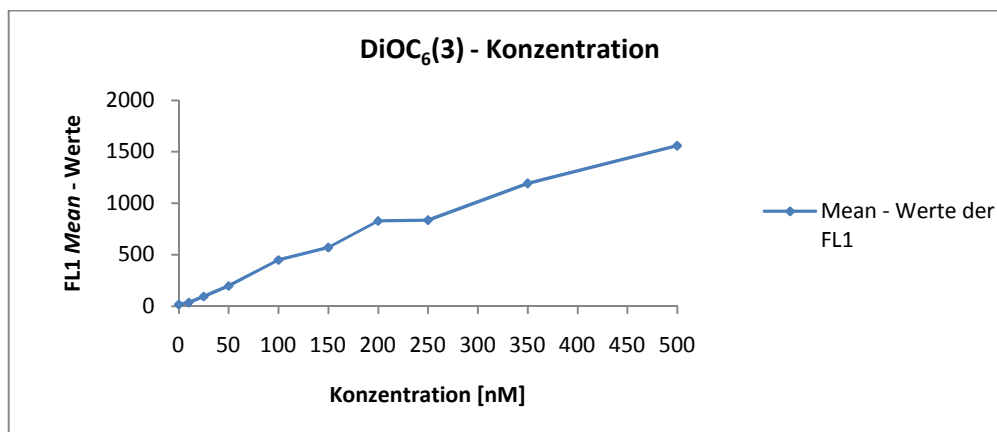
Die beiden Parameter FSC und SSC spiegeln morphologische Charakteristika der Zellen wider. Um mögliche Subpopulationen innerhalb der beiden HK zu finden, erfolgte die zweiparametrische Darstellung von FSC und SSC in Form von Dotplots. Unter Anlagen (Teil 1) sind die flowzytometrischen Daten zusammengefasst. Jedoch konnten innerhalb der HK1 und HK2 keine Subpopulationen im Hinblick auf Zellgröße und Granularität detektiert werden.

### 3.2.1.3 Membranpotentialbestimmung

Um die Vitalität des Expressionsstammes *putA\_pEKE-hyp1* nach t = 7 h beurteilen zu können, erfolgte eine Zellfärbung mittels DiOC<sub>6</sub>(3). Der positiv geladene lipophile Cyaninfarbstoff bindet an die negativ geladenen Phospholipidköpfchen der inneren Membran vitaler Zellen. [51] [52] Dies sind diejenigen Zellen, die ein hohes Membranpotential (> - 100 mV) besitzen, welches aufgrund der aktiven Atmungskette entsteht. [36] [38]

Um eine geeignete DiOC<sub>6</sub>(3) - Konzentration zu finden, wurden die Zellen verschiedenen Farbstoffkonzentrationen ausgesetzt und flowzytometrisch untersucht (Abb. 10). Für alle weiteren Untersuchungen wurde eine Farbstoffkonzentration von 50 nM verwendet, da bei der verwendeten

Färbeprozedur eine unspezifische Farbstoffanlagerung ausgeschlossen werden konnte. Unter Anlagen (Teil 1) sind die Messdaten zusammengefasst.

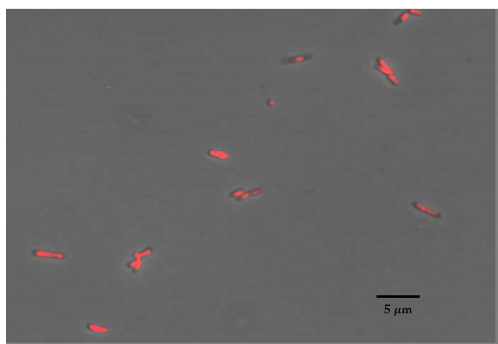


**Abbildung 10: Test verschiedener DiOC<sub>6</sub>(3) - Konzentrationen**

In Abb. 10 ist zu erkennen, dass die FL1 mit steigender Konzentration an DiOC<sub>6</sub>(3) zunimmt, wobei bei der Konzentration von 200 nM ein Plateau zu erkennen ist. Hierbei kann man davon ausgehen, dass die Färbung eine Sättigung erreicht, d. h. bei steigender Farbstoffkonzentration ist keine Zunahme der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. [53] Dabei kann angenommen werden, dass es zu einer Farbstoffanlagerung in den Zellen kommt, die nicht mit dem Membranpotential korreliert. Diesbezüglich könnten intrazelluläre Anlagerungen von DiOC<sub>6</sub>(3) an alternative zelluläre Bindungsstellen (bspw. hydrophobe Bereiche der Membran) [54] oder zellulärer Lipide vorliegen. [55] Um diese unspezifische Anlagerung zu zeigen, wurden Zellen für 10 min bei 70 °C inkubiert und unter gleichen Bedingungen gefärbt ( $c_{\text{End}} = 50 \text{ nM}$ ). Unter Anlagen (Teil 1) ist die Gegenüberstellung hitzebehandelter (70 °C) und RT - behandelter Zellen zu finden. Weiterhin sollte die optimale Inkubationszeit für die Membranpotentialfärbung bestimmt werden (siehe Anlagen, Teil 1). Für alle weiteren Färbungen wurde die Inkubationszeit von  $t = 10 \text{ min}$  gewählt, da hier ein Großteil der Färbung abgeschlossen ist. Dem hinzuzufügen sei, dass längere Färbezeiten (bspw. 1 h) den Anteil aktiver Zellen verringern können.

Um zu überprüfen, ob das gemessene FL1 das Membranpotential widerspiegelt, wurden Veränderungen des Membranpotentials mittels CCCP und Valinomycin hervorgerufen. Unter Anlagen (Teil 1) sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DiOC<sub>6</sub>(3) - gefärbten Zellen nach CCCP - und Valinomycinbehandlung dargestellt. Dabei kann man deutlich die Abnahme der Fluoreszenzintensität nach CCCP - Zusatz beobachten. So erfolgt aufgrund des Protonophors CCCP eine Zerstörung des Membranpotentials. [56] Es kommt zu einer Depolarisierung der Membran, sodass das Potential im Zellinneren steigt, d.h. es wird positiver. Im Gegensatz dazu erkennt man nach der Valinomycinzugabe die Zunahme der Grünfluoreszenz. Dies beruht auf der Tatsache, dass

das kaliumselektive Ionophor Valinomycin eine Hyperpolarisierung der Membran verursacht, sodass es zu einer Abnahme der positiven Ladungen im Zellinneren kommt, d.h. es wird negativer. [57] Weiterhin wurden ethanolfixierte Zellen einer Doppelfärbung mit PI und DiOC<sub>6</sub>(3) unterzogen, um zu zeigen, dass Zellen ohne intaktes Membranpotential den Vitalfarbstoff nicht einlagern. So ist in Abb. 11 zu sehen, dass alle Zellen ausschließlich den rot fluoreszierenden Farbstoff PI aufgenommen haben. Dieser hydrophile kationische Fluoreszenzfarbstoff wird häufig als mikrobieller Membranintegritäts - Indikator verwendet, welcher in der Lage ist, tote Zellen zu färben. [51]



**Abbildung 11: Doppelfluoreszenz ethanolfixierter Zellen (-/- Ansatz)**

Da gezeigt werden konnte, dass vitale Zellen den Farbstoff DiOC<sub>6</sub>(3) und im Gegensatz dazu tote Zellen PI aufnehmen, könnte mittels einer Doppelfärbung der lebend - tot - Anteil im Expressionsstamm bestimmt werden. Hierbei ist von Interesse, wie sich dieses Verhältnis zwischen (-/-) und (+/+) - Ansatz verschiebt, um Aussagen über den Einfluss der heterologen Proteinexpression auf die Vitalität der Population im biotechnologischen Prozess treffen zu können.

#### **3.2.1.4 Sortierung der Subpopulationen**

Um eine gezielte Splittung in den Streulichtsignalen (FSC, SSC) der Zellen des (+/+) - Ansatzes zu erreichen, erfolgte das Animpfen dreier HK (HK3 - HK5) mittels unterschiedlich alter VK - Ansätze. So wurden nun – zur Inokulation der jeweiligen HK – Zellen nach 7 h, 14 h und 24 h aus der VK3 entnommen. Bei diesem Versuch ist jedoch zu beachten, dass sich an die VK1 zwei induzierte VK anschlossen (VK2, VK3). Die flowzytometrischen Daten sind unter Anlagen (Teil 1) zu finden. Dabei wird ersichtlich, dass die größte Aufsplittung in HK3 auftritt (7 h - Ansatz). Die Ursache für höhere Streulichtsignale mancher Zellen könnte in der Bildung von „inclusion bodies“ von Hyp1 begründet liegen. Dies sind fehlgefaltete bzw. unvollständig gefaltete Proteinaggregate [11] innerhalb der Zellen, welche für ein höheres SSC verantwortlich sein könnten. Diese werden häufig bei der Überexpression heterologer Proteine gebildet, jedoch sind diese unvorteilhaft für den Biotransformationsprozess, da das Protein inaktiv vorliegt. [11] Die Bildung dieser unlöslichen



Aggregate kann durch Verminderung der Temperatur, dem Einsatz schwacher Promotoren und geringerer Konzentrationen des Induktors verringert werden. [58] Die beiden ersten Punkte wurden in diesem Versuch realisiert, da eine Kultivierungstemperatur von 30 °C (Temperaturoptimum *E. coli*: 37 °C) und der schwache lac - Promotor gewählt wurden. Die Induktorkonzentration liegt in der gesamten Kultivierung bei 1 mM, jedoch gelten IPTG - Konzentrationen < 100 µM als optimal. [58] Jedoch sollte in diesem Teil der Arbeit die Bildung von Subpopulationen bewusst hervorgerufen werden. Dies erfolgte mittels exponentieller Zellen, die in der HK3 in eine Subpopulation splitteten, die vermutlich aus dem Zellzyklus austrat und im Zuge der heterologen Überexpression „inclusion bodies“ produzierte. Eine weitere Subpopulation entstand, deren Zellen womöglich den Zellzyklus ungestört weiterführten. Weiterhin ist den Daten zu entnehmen, dass der Anteil der entsprechenden Subpopulationen mit zunehmender Zeit in der HK abnimmt. Diese Tatsache lässt sich anhand neu entstandener Zellen erklären, da diese keine „inclusion bodies“ tragen. Unter Anlagen (Teil 2) sind die prozentualen Anteile der Subpopulationen zusammengestellt. In HK4 (14 h Inokulum) und HK5 (24 h Inokulum) sind keine Subpopulationen mit entsprechenden Anteilen zu erkennen.

Da die größte Spaltung in HK3 zu finden ist, erfolgte die Sortierung der drei Subpopulationen mittels der in Abb. 12 und 13 gekennzeichneten Gates (R1, R2, R3). Dazu wurden die DAPI - gefärbten Proben t = 2 h und t = 3 h anhand der FL4 - und FSC - Signale gegatet. Diese separierten Proben wurden anschließend einer LC - MS Analyse der Proteine unterzogen (siehe 3.3.1) und in Hinblick auf unterschiedliche Expressionsmuster in den einzelnen Zellen untersucht.

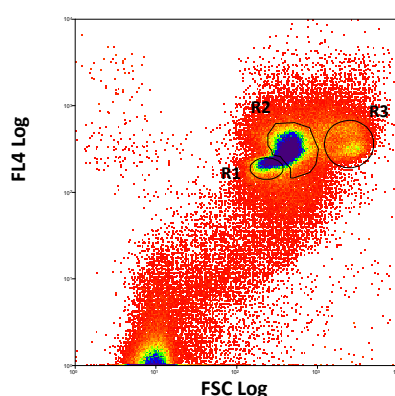


Abbildung 12: HK3, 7 h Inokulum, t = 2 h (+/+)

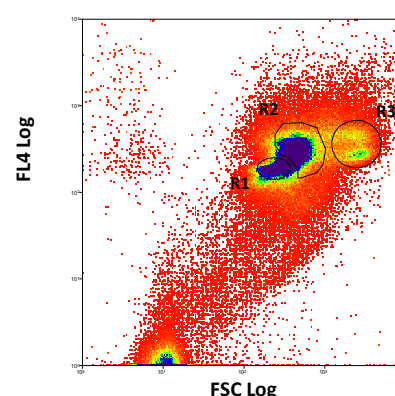


Abbildung 13: HK3, 7 h Inokulum, t = 3 h (+/+)

Um genügend Zellen für die anschließende Proteomuntersuchung bereit zu stellen, erfolgte das Poolen der beiden Proben t = 2 h und t = 3 h. Die folgende Tabelle (Tabelle 7) zeigt die Anzahl der sortierten Zellen aus den einzelnen Gates. Als Referenz für spätere Berechnungen wurde eine weitere Membran mit  $5,1 \cdot 10^6$  Zellen der Gesamtproben t = 2 h und t = 3 h beladen.

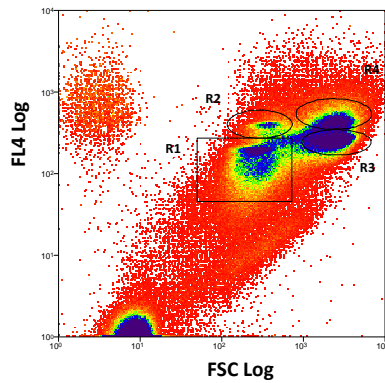
**Tabelle 7: Zellzahlen der Gates R1, R2, R3 (HK3)**

Gate	Zellzahl
R1	$2,4 \cdot 10^6$
R2	$5,6 \cdot 10^6$
R3	$1,9 \cdot 10^6$

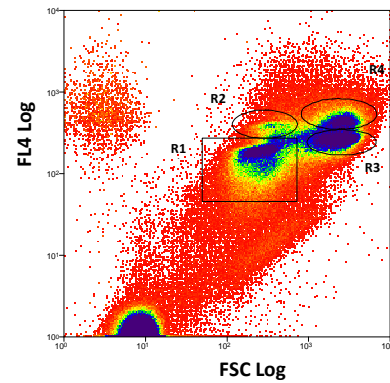
### **3.2.2 Sortierung der Subpopulationen des Stammes pEKE-*hyp1***

Neben dem Expressionsstamm *putA\_pEKE-hyp1* wurde ebenfalls der Referenzstamm pEKE-*hyp1* auf Subpopulationen analysiert und diese anschließend einer Separierung unterzogen. Hierbei wurden Zellen verwendet, die bereits einige Monate fixiert waren (Wachstumskurve HK6), siehe Anlagen, Teil 1). [59] Die Kultivierung erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Im Gegensatz zu dem Stamm *putA\_pEKE-hyp1* (7 h Inokulum, HK3) konnten in diesem Falle Subpopulationen nach 24stündiger Inkubation der VK3 identifiziert werden. Außerdem konnte eine Abnahme der Subpopulation mit hohen SSC/FSC - Signalen im Laufe des Wachstums der HK6 verzeichnet werden.

Zunächst musste flowzytometrisch überprüft werden, ob die Population immer noch ähnliche Streulicht - und DAPI - Signale zeigt. Dazu wurden zwei Proben verwendet, deren Daten unter Anlagen (Teil 1) zu finden sind. Dabei wird ersichtlich, dass die Population auch nach 4 Monaten Fixierung eine sehr ähnliche Verteilung liefert. So sind nahezu identische Aufsplittungen in den Dotplots (FL4/FSC bzw. SSC/FSC) zu erkennen. Jedoch kann man deutlich beobachten, dass die älteren Proben geringere FL4 - Signale liefern, da wahrscheinlich ein Abbau der DNA stattgefunden hat. Ebenfalls weisen die über 4 Monate fixierten Zellen im Gegensatz zu den 24 h Proben kleinere FSC - Signale auf. Weiterhin wurden viele Ereignisse in den beiden linken Quadranten oberhalb des *noise* - Signals detektiert, die ein sehr kleines FSC aufweisen. Dies könnten Zelltrümmer zerstörter Zellen sein. Im Hinblick auf die Granularität der Zellen können keine deutlichen Veränderungen festgestellt werden, sodass dies ein Indiz für einen geringen proteolytischen Abbau sein könnte. Die in Abb. 14 und 15 dargestellten Subpopulationen wurden für eine LC - MS Messung der Proteine sortiert, wobei anhand der DAPI - gefärbten Zellen eine Gatesetzung bezüglich FL4 und FSC erfolgte.



**Abbildung 14: HK6, t = 0 h (+/+)**



**Abbildung 15: HK6, t = 1 h (+/+)**

Die beiden Proben t = 0 h und t = 1 h des (+/+) - Ansatzes wurden gepoolt, um – wie bereits unter 3.2.1.4 erwähnt – genügend Zellen für die Proteomanalyse zu erhalten. Tabelle 8 zeigt die resultierenden Zellzahlen nach der Sortierung. Um die Daten der LC - MS - Messung in Relation setzen zu können, wurde eine weitere Membran mit  $6,3 \cdot 10^6$  Zellen der Gesamtprobe t = 2 h beladen. Jedoch ist diese Zellzahl ungenau, da keine exakte Bestimmung mittels Beads erfolgen konnte. Dies lag an einer hohen Anzahl an Signalen, die vom *noise* zu den Zellsignalen übergingen und sich somit eine genaue Abgrenzung schwierig gestaltete.

**Tabelle 8: Zellzahlen der Gates R1 - R4 (HK6)**

Gates	Zellzahl
R1	$2,6 \cdot 10^6$
R2	$0,33 \cdot 10^6$
R3	$1,5 \cdot 10^6$
R4	$0,73 \cdot 10^6$

### 3.3 Proteomanalyse

Die Untersuchung der heterologen Expression, sowie weiterer Proteine der beiden Stämme, erfolgte durch den Einsatz von massenspektrometrischen Analysen. Im Vorhinein wurde mittels einer SDS - PAGE [59] die heterologe Proteinexpression auf Populationsebene mit anschließender MALDI - TOF Messung überprüft. Es wurde gezeigt, dass die Hyp1 - Bande des 1D - Gels eine hohe Anzahl anderer Proteine aufwies und somit einen sicheren Hyp1 - Nachweis unmöglich machte. Somit wurden alle weiteren Untersuchungen mit Hilfe der LC - ESI - MS durchgeführt, da diese Methode eine Analyse komplexerer Peptidgemische ermöglicht. Außerdem erlaubt diese Methode den Einsatz geringer Zellzahlen, sodass sortierte Zellen untersucht werden konnten.

#### 3.3.1 Der Stamm *putA\_pEKE-hyp1*

In Hinsicht auf den Expressionsstamm *putA\_pEKE-hyp1* waren die Veränderungen des Expressionsprofils zum Einen in Abhängigkeit der Zeit von großem Interesse, sodass verschiedene Zeitpunkte der Wachstumskurven HK1 und HK2 analysiert wurden (siehe 3.3.1.1). Zum Anderen erfolgte eine proteomische Charakterisierung der sortierten Subpopulationen der HK3, welche in Hinblick auf eine veränderte Hyp1 - Expression und weiterer Proteine betrachtet wurden (siehe 3.3.1.2).

##### 3.3.1.1 Gesamtproteom

Zunächst soll auf die *MaxQuant* - Daten von HK1 eingegangen werden, wobei je Induktionsansatz drei Proben (t = 9 h, 12 h, 16 h) ausgewählt wurden. Dazu zeigt Abb. 16 die relativen Intensitäten des rekombinanten Proteins Hyp1 in Zusammenhang mit dem Wachstumsverlauf. Da zum Zeitpunkt t = 9 h des (+/+) - Ansatzes die höchste Intensität von Hyp1 besteht, wurde dieser Wert auf 100 % gesetzt, um die restlichen Werte zu Relativieren.

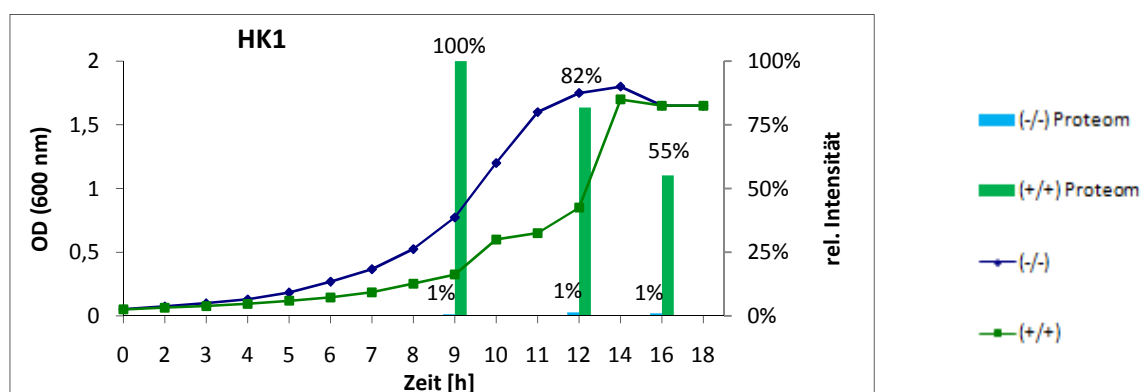


Abbildung 16: relative Hyp1 - Quantität des Stammes *putA\_pEKE-hyp1* im Laufe des Wachstums (gerundete Werte), HK1

Zunächst lässt sich feststellen, dass die Expression im (+/+) - Ansatz im Vergleich zum (-/-) - Ansatz erhöht ist. Anhand der genauen Werte konnte bspw. zur Stunde 9 eine Erhöhung um das 170fache berechnet werden. Daraus lässt sich eine erfolgreiche Induktion und somit Expression von Hyp1 ableiten. Die dennoch geringfügige Hyp1 - Konzentration im Kontrollansatz wird durch die eingangs erwähnte Hintergrundexpression des lac - Promotors verursacht. Weiterhin ist zu sehen, dass in der (früh -)exponentiellen Phase (t = 9 h) die Quantität des rekombinanten Proteins am höchsten ist und mit steigender Zeit abnimmt. So ist eine Halbierung des Intensitätswertes nach t = 16 h zu verzeichnen. Die Hyp1 - Quantität der HK2 ist in Abb. 17 nun (analog Abb. 16) dargestellt, wobei die Zeitpunkte t = 10 h, 12 h und 16 h für eine Analyse ausgewählt wurden. Da der maximale Intensitätswert bei t = 10 h des (+/+) - Ansatzes lag, wurde dieser Wert auf 100 % gesetzt.

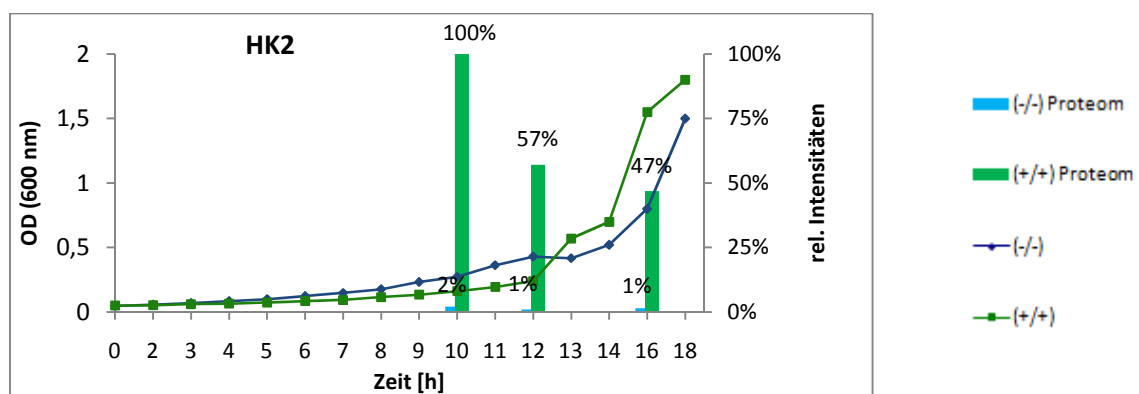


Abbildung 17: relative Hyp1 - Quantität des Stammes *putA\_pEKE-hyp1* im Laufe des Wachstums (gerundete Werte), HK2

Wie bereits bei HK1 erwähnt, zeigt HK2 ebenfalls eine erfolgreiche Hyp1 - Expression im (+/+) - Ansatz. Anhand der exakten Werte konnte bspw. zu t = 10 h eine Erhöhung um das 47fache festgestellt werden. Außerdem lässt sich an den geringen (-/-) - Intensitäten, im Vergleich zum (+/+) - Ansatz, die Hintergrundexpression erkennen. Im Gegensatz zu HK1 (Abb. 16) lässt sich in Abb. 17 jedoch eine stärkere Abnahme der Hyp1 - Quantität feststellen. So sinkt die Konzentration des rekombinanten Proteins bereits nach t = 12 h auf nahezu die Hälfte der Anfangsintensität (t = 10 h).

Die Abnahme der Hyp1 - Quantität in den (+/+) - Ansätzen beider HK könnte an einem Abbau des rekombinanten Proteins durch ATP - abhängige Proteasen liegen. [60] Um dies zu überprüfen, wurden die Quantitäten dieser Proteine zum Einen für (+/+) - und (-/-) - Ansatz ins Verhältnis gesetzt und graphisch aufgetragen (Anlagen, Teil 2). Zum Anderen wurden die Intensitäten im zeitlichen Verlauf des (+/+) - Ansatzes dargestellt (Anlagen, Teil 2).

Weiterhin soll ein Vergleich der Hyp1 - Intensitäten zwischen den beiden HK erfolgen, sodass Abb. 18 eine Gegenüberstellung der Quantitäten zeigt. Dabei wurde der Intensitätswert t = 9 h des

(+/+) - Ansatzes der HK1 auf 100 % gesetzt. Es ist – wie bereits erwähnt – zu sehen, dass die Abnahme der Hyp1 - Konzentration in HK2, im Gegensatz zur HK1, gravierender ist. Jedoch ist zu erkennen, dass die Quantität in HK2 insgesamt im Vergleich zur HK1 deutlich höher ist. So unterschieden sich die Mengen des rekombinanten Proteins zum Teil um 20 % (t = 9 h bzw. 10 h). Zum Zeitpunkt t = 16 h hingegen sind die Quantitäten von Hyp1 in beiden HK nahezu gleich.

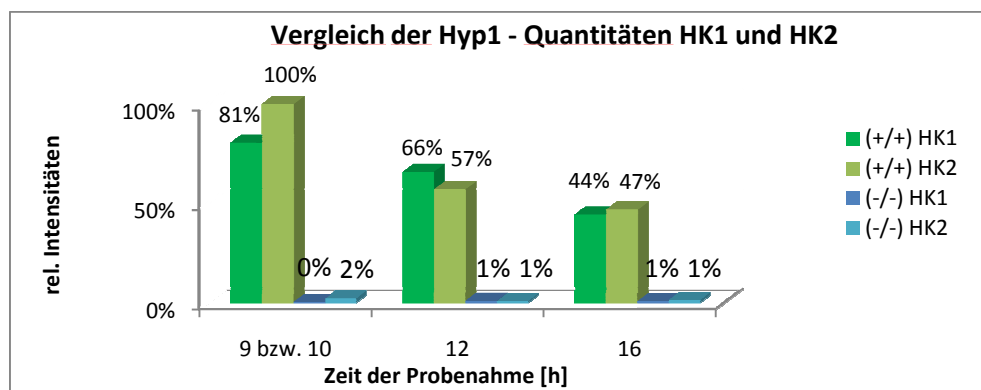


Abbildung 18: Vergleich der Hyp1 - Quantitäten in HK1 und HK2 (gerundete Werte)

Die in Abb. 18 zu erkennenden unterschiedlichen Hyp1 - Quantitäten sind in Hinblick auf den Biotransformationsprozess nachteilig. Deshalb muss in biotechnischen Prozessen das Expressionsverhalten genau bekannt sein, um optimale Ausbeuten zu erhalten.

Neben der Quantifizierung von Hyp1 sollten „housekeeping“ Proteine in die Auswertung einbezogen werden (Abb. 19). So sind die beiden ATP Synthase Untereinheiten Alpha und Beta, die Chaperonine GroEL und GroES, sowie das Membranprotein OmpA in Zusammenhang mit Hyp1 der HK1 dargestellt.

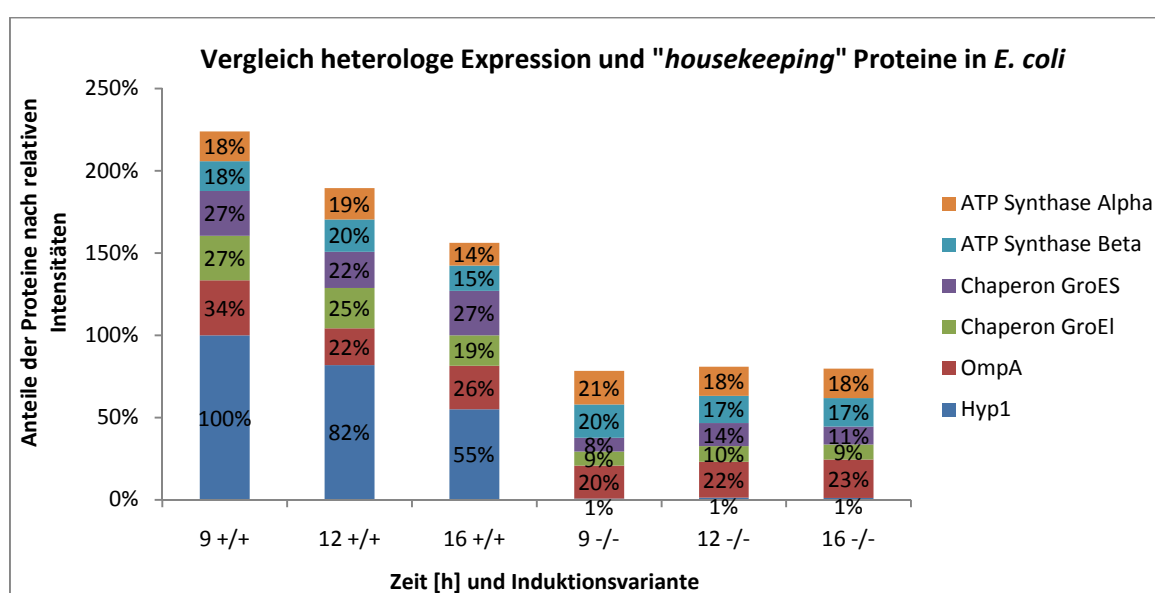


Abbildung 19: Vergleich Hyp1 und "housekeeping" Proteine *E. coli*, HK1 (gerundete Werte)

Da der maximale Intensitätswert dem Protein Hyp1 bei  $t = 9$  h des (+/+) - Ansatzes zuzuordnen ist, wurde dieser Wert auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte in Relation zu diesem berechnet. Zunächst soll sich auf die Proben des (+/+) - Ansatzes konzentriert werden, die den Zeitpunkten  $t = 9$  h, 12 h und 16 h entstammten. Betrachtet man die zeitliche Veränderung der Hyp1 - Quantität so wird wie bereits in den Abb. 16 und 18 beschrieben, die Abnahme deutlich. Im Gegensatz dazu fällt die zeitlich nahezu konstante Menge der „housekeeping“ Proteine des Stammes auf. Ebenfalls ist auffällig, dass das rekombinante Protein überexprimiert vorliegt, sodass auch hier eine erfolgreiche Induktion und Expression bestätigt werden kann. Betrachtet man nun die (-/-) - Ansätze im zeitlichen Verlauf ( $t = 9$  h, 12 h, 16 h) so fällt analog zu den Abb. 16 und 18 die schwache Hintergrundexpression von Hyp1 auf. Außerdem wird die zeitlich nahezu konstante Quantität der „housekeeping“ Proteine ersichtlich. Vergleicht man nun die (+/+) - mit den (-/-) - Proben im zeitlichen Verlauf, fallen neben dem rekombinanten Protein Hyp1 zwei weitere Proteine auf, die eine signifikant abweichende Expression aufweisen. Hierbei handelt es sich um die beiden Chaperonine GroEL und GroES, welche eine wichtige Rolle bei dem Faltungsprozess eines Proteins spielen. [60] Die Gegenüberstellung von Hyp1 und „housekeeping“ Proteinen von HK2 ist unter Anlagen (Teil 2) zu finden, jedoch wurde keine explizite Auswertung vorgenommen.

Um das gesamte Expressionsprofil des Expressionsstammes im zeitlichen Verlauf zu zeigen, wurden alle detektierten Proteine (insgesamt 855) der HK1 in Abb. 20 dargestellt.

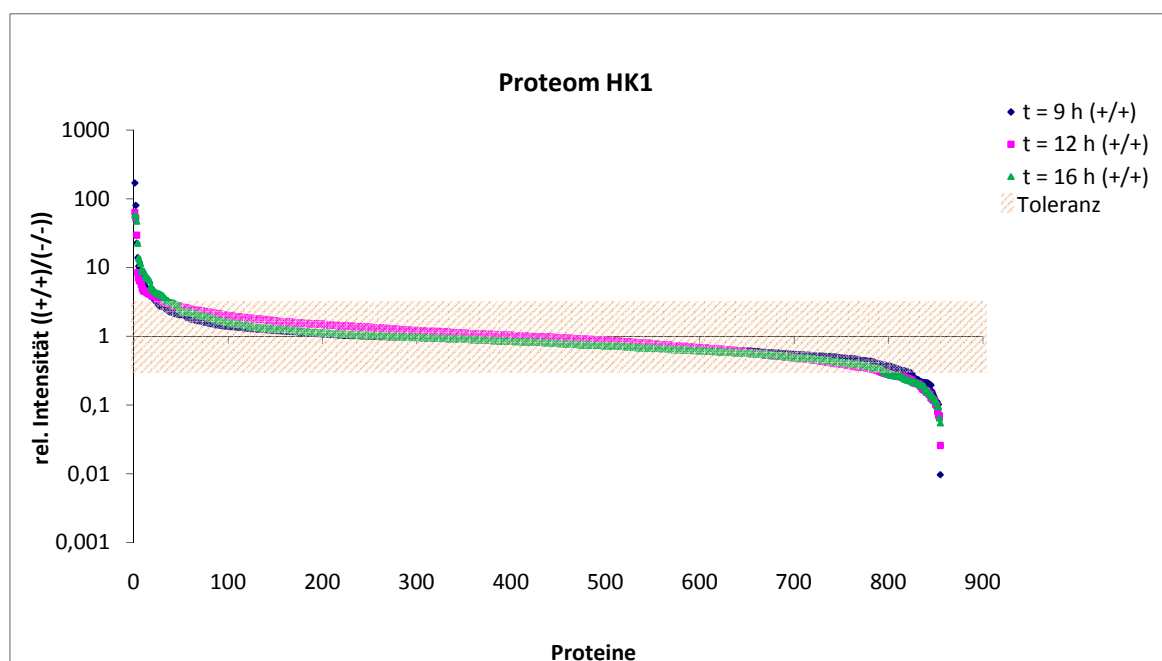


Abbildung 20: Expressionsprofil von *putA\_pEKE-hyp1* in HK1

Die Werte für die graphische Darstellung in Abb. 20 wurden wie folgt berechnet. Für jeden Zeitpunkt getrennt, erfolgte die Division der Intensitätswerte des (+/+) - Ansatzes durch die Werte

des (-/-) - Ansatzes des jeweiligen Proteins. Dies bedeutet, dass der Kontrollansatz als Referenz für die (+/+) - Quantitäten verwendet wurde und somit eine Hoch - oder Runterregulation der Expressionen erkennbar wird. Außerdem wurden die Proteine ausgeschlossen, die in mindestens einer der drei dargestellten Proben eine Intensität gleich „0“ besaßen, da ein Vergleich zwischen allen Proben erfolgen sollte. Es erfolgte außerdem eine absteigende Sortierung der relativen Intensitäten für jeden Zeitpunkt getrennt. Grundsätzlich betrachtet unterscheiden sich die Verläufe des Proteoms der drei Zeitpunkte nur sehr gering. Um einen groben Toleranzbereich einzuführen, sollten ausschließlich Proteine mit Abweichungen des Faktors „ $\geq 5$ “ bzw. „ $\leq 0,2$ “ betrachtet werden (siehe Abb. 20). Der Toleranzbereich umfasst nichtregulierte Proteine, sodass Messabweichungen nivelliert werden. Grundsätzlich zählen jedoch Abweichungen des Faktors „ $\geq 2$ “ bzw. „ $\leq 0,5$ “ als signifikant (persönliche Mitteilung Jana Seifert), wie später verwendet. In Abb. 20 wird ersichtlich, dass der Großteil der Proteine keine signifikante Hoch - bzw. Runterregulation im Laufe der Induktion erfahren hat. Unter Anlagen (Teil 2) sind alle Proteine außerhalb des eingeführten Toleranzbereiches zu den Zeitpunkten  $t = 9\text{ h}$ ,  $12\text{ h}$  und  $16\text{ h}$  aufgelistet. Betrachtet man die Hochregulation, so fallen vier Proteine auf, die in allen der drei Proben mit dem gesetzten Toleranzbereich vorkommen. Neben Hyp1 sind dies das Hitzeschockchaperone IbpA, die Katalase - Peroxidase HPI (Hydroperoxidase I) und die Acetolactatsynthase, auf die nicht näher eingegangen werden soll. Eine graphische Darstellung des gesamten Expressionsprofils, sowie eine Auflistung hoch - und runterregulierter Proteine, ist für die HK2 unter Anlagen (Teil 2) zu finden. Hierbei werden wieder insgesamt vier Proteine, die zu allen drei Zeitpunkten hochreguliert vorkommen, sichtbar. Im Vergleich zu HK1 sind neben Hyp1 die beiden Hitzeschockchaperone IbpA und IbpB, sowie der Serintransporter zu finden. Da in beiden HK eine starke Hochregulation von IbpA zu verzeichnen ist, kann ein Zusammenhang zwischen der Hyp1 - Überexpression und diesem Protein vermutet werden. IbpB ist in HK1 ebenfalls stark hochreguliert, jedoch besitzt dieses Protein zum Zeitpunkt  $t = 16\text{ h}$  im (-/-) - Ansatz eine Intensität gleich „0“ und wurde somit in dieser HK von einer Betrachtung ausgeschlossen. Diese sogenannten „*inclusion body - associated proteins*“ A und B binden an fehlgefaltete bzw. aggregierte Proteine, sodass sie eine prägnante Rolle bei der Überexpression rekombinanter Proteine spielen. [61] Neben dieser Funktion sind die beiden Proteine IbpA/B außerdem an einer Bindung und Stabilisierung hitzedenaturierter Proteine beteiligt. [68] Weiterhin wird in beiden HK ersichtlich, dass alle aufgelisteten runterregulierten Proteine (Anlagen, Teil 2) hauptsächlich nur in jeweils einer der drei Proben mit dem gewählten Toleranzbereich zu finden sind.

Eine Fehlerquelle der Auswertung der Daten ist, dass die hier dargestellten Daten aus einer Messung stammten. Für zuverlässige Daten bedarf es einer zweifachen Messung und zudem sind drei biologische Replikate erforderlich.



### 3.3.1.2 Sortierte Proben

Die sortierten Proben und die Gesamtpopulation der HK3 ( $t = 2\text{ h}, 3\text{ h}$ ) wurden einer doppelten Messung unterzogen, um zuverlässigere Daten zu erhalten. Zunächst soll sich auf die Hyp1 - Quantität konzentriert werden, so stellt Abb. 21 die relativen Intensitäten des rekombinanten Proteins für die einzelnen Subpopulationen dar. Hierbei wurden die Intensitäten der Subpopulationen in Relation zur Gesamtpopulation berechnet, um Unterschiede im Bezug auf die Expression des rekombinanten Proteins erkennen zu können. Es spielt jedoch ausschließlich der (+/+) - Ansatz eine Rolle, im Gegensatz zu 3.3.1.1, da dort die Intensitäten auf den (-/-) - Ansatz bezogen wurden. In Abb. 22 wurden die Intensitäten durch die Zellzahlen (siehe 3.2.1.4) dividiert, um die Hyp1 - Menge pro Zelle zu verdeutlichen.

In beiden Abbildungen wird deutlich, dass die Zellen des Gates R3 eine deutlich höhere Menge an Hyp1 aufweisen, als die Gesamtpopulation. Weiterhin ist den Abb. 21 und 22 zu entnehmen, dass die Subpopulationen der Gates R1 und R2 im Vergleich zur gesamten Population geringere Konzentrationen des rekombinanten Proteins besitzen. Dies bedeutet, dass die Subpopulation mit den größten Zellen und gleichzeitig auch der größten Granularität (R3), eine deutlich höhere Quantität an Hyp1 liefert, als die kleineren Zellen aus R1 und R2. Ob hierbei die Bildung von „inclusion bodies“ eine Rolle spielt, kann an dieser Stelle nicht explizit festgestellt werden, jedoch liegt die Vermutung nahe.

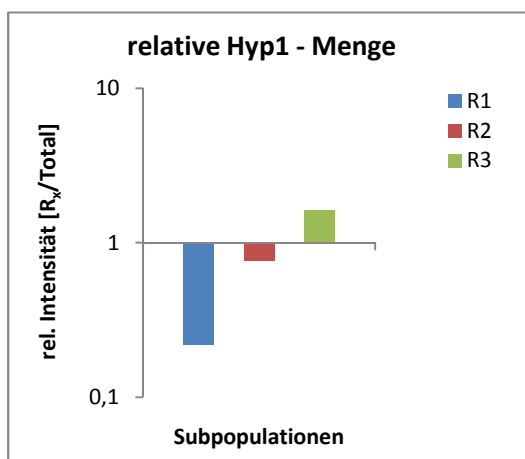


Abbildung 21: relative Hyp1 - Quantität, HK3

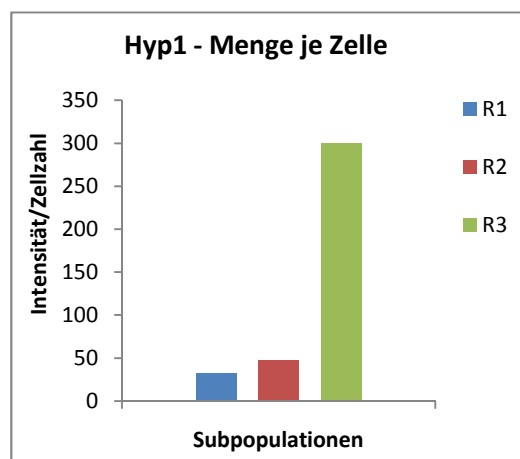


Abbildung 22: Hyp1 - Quantität je Zelle, HK3

Neben Hyp1 sollten weitere Proteine in die Auswertung einbezogen werden, da auf Proteinebene nach möglichen Ursachen für das Auftreten von Subpopulationen gesucht werden sollte. Für eine Charakterisierung der Expressionsmuster in den einzelnen Subpopulationen sollten Proteine des Zellzyklus, des TCA - Zyklus, der Prolinbiosynthese und der Stressantwort einbezogen werden. Die Quantitäten der einzelnen Proteine der jeweiligen Subpopulation (R1, R2, R3) wurden in Relation

zur Gesamtpopulation gesetzt und in den folgenden Abbildungen graphisch dargestellt. Die aufsteigende Sortierung der Werte erfolgte anhand „R1/Total“ und wurde für die beiden weiteren Subpopulationen übernommen. Als hoch - bzw. runterreguliert werden die Proteine angesehen, bei denen der Wert um einen Faktor „ $\geq 2$ “ bzw. „ $\leq 0,5$ “ abweicht. In Abb. 23 erfolgt zunächst die Gegenüberstellung der Proteine des Zellzyklus.

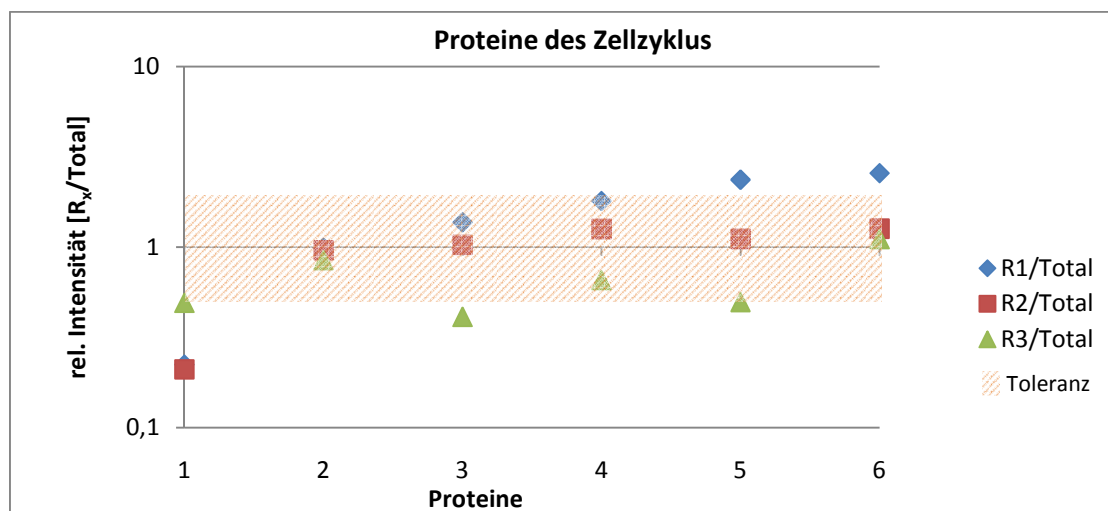


Abbildung 23: Vergleich Proteine Zellzyklus, HK3. 1: Zellteilungsprotein MukB (gi 157160445); 2: Peptidyl - Prolyl - cis/trans - Isomerase (gi 157159963); 3: UDP - N - acetylglucosamin 1 - carboxyvinyltransferase (gi 110643429); 4: Zellteilungsprotein FtsZ (gi 110640308); 5: Zellteilungsprotein DamX (gi 16131266); 6: Metalloprotease FtsH (gi 157162661)

Zunächst ist zu sehen, dass die Proteine 2 und 4 in allen der drei Subpopulationen innerhalb des festgelegten Toleranzbereiches liegen. Vor allem bei R2 wird erkennbar, dass kaum eine abweichende Expression zur Gesamtpopulation auftritt. Das einzig regulierte Protein ist das Zellteilungsprotein MukB (Protein 1), welches bei allen der drei Subpopulationen eine Runterregulation im Verhältnis zur Gesamtpopulation aufweist. Es besteht jedoch bei den Subpopulationen R1 und R2 eine deutlich signifikantere Regulation, als bei R3. Die Struktur von MukB ist eng mit den *Structural Maintenance of Chromosomes (SMC)* - Proteinen verwandt und spielt bei der Kondensation, Faltung und Aufteilung der Chromosomen eine wichtige Rolle. [62] Betrachtet man nun die Subpopulation R3, so ist auffallend, dass nahezu alle Zellzyklusproteine einer Runterregulation unterliegen. Bringt man sich die flowzytometrischen Daten in Erinnerung, so zeichneten sich die Zellen von R3 durch eine hohes FSC und FL4 aus. Vermutlich sind diese Zellen mit einem vielfachen Chromosomensatz zwar in der Lage zur Replikation ihrer DNA, jedoch findet keine Zellteilung statt. [63] Die Zellen des Gates R1 hingegen zeigen neben der Runterregulation ebenfalls stärker exprimierte Proteine. Diese heterogene Expression zwischen den Subpopulationen wird besonders bei den beiden Zellteilungsproteinen 4 und 5 deutlich. So soll zunächst auf FtsZ eingegangen werden. Dieses tubulinartige Protein lagert sich zu einem dynamischen Ring (Z - Ring)

an der Teilungsstelle der Zelle zusammen. [64] An diesem Ring kommt es zur Bindung weiterer Proteine, sodass die Ausbildung des Septalringes erfolgt. [65] Eines der etwa 12 bekannten, am Septalring bindenden, Proteine ist DamX. [64] Eine Regulation dieser beiden erwähnten Proteine könnte nun in einer fehlerhaften Zellteilung resultieren, sodass hier eine Ursache für die unterschiedlichen Streulichtsignale bezüglich R1 und R3 zu finden ist. Auf weitere Proteine soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

Weiterhin soll Abb. 24 die Proteine des TCA - Zyklus zeigen, wobei die Berechnung der Werte und die Sortierung analog zu denen des Zellzyklus erfolgte (Abb. 23).

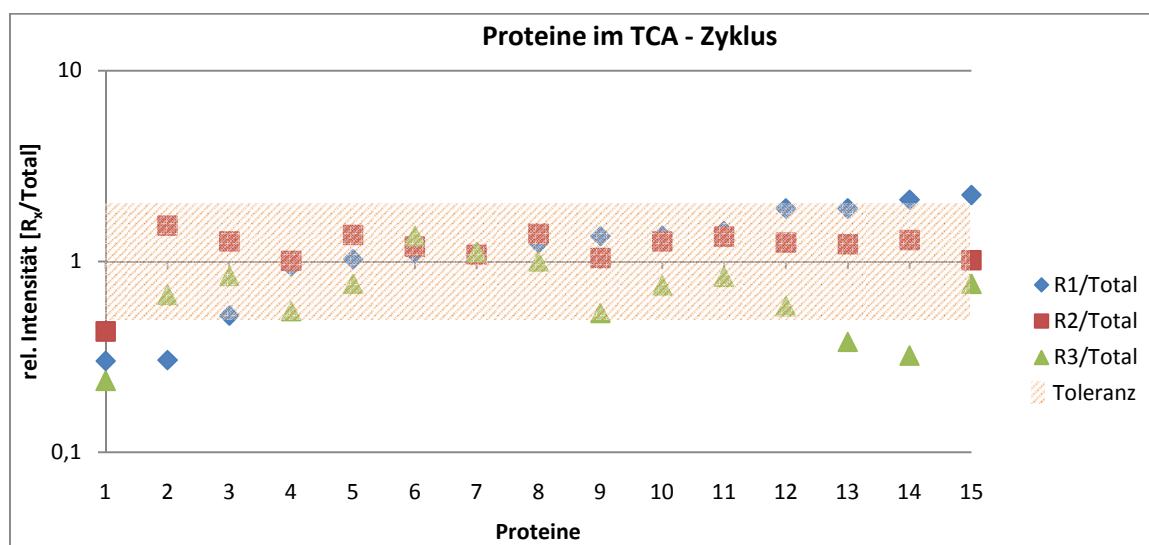
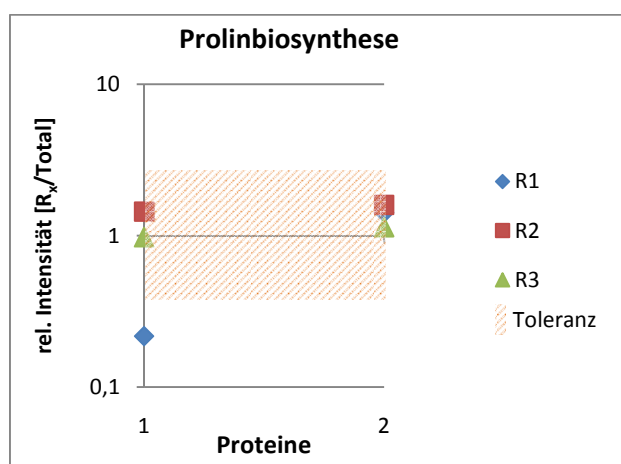


Abbildung 24: Vergleich Proteine im TCA - Zyklus, HK3. 1: Isocitratdehydrogenase (gi 110641313), 2: Malatdehydrogenase (Quinone) (gi 157161692), 3: Succinatdehydrogenase, Eisen - Schwefel Untereinheit (gi 16128699), 4: Malatdehydrogenase (gi 110643470), 5: Succinyl - CoA Synthetase Beta (gi 110640936), 6: Malatsynthase A (gi 16131840), 7: Aconitase (gi 157159586), 8: Typ II Citratsynthase (gi 110640928), 9: Phosphoenol - pyruvatcarboxylase (gi 110640928), 10: 2 - Oxoglutaratdehydrogenase E1 (gi 110640934), 11: Succinyl - CoA Synthetase Alpha (gi 110640937), 12: Succinatdehydrogenase Flavoproteinuntereinheit (gi 110640932), 13: Fumarathydrotase (gi 110641733), 14: Malatsynthase G (gi 110643207), 15: Dihydroliipoamid Succinyltransferase (gi 157160206)

Betrachtet man Abb. 24, so wird deutlich, dass nur sehr wenige Proteine in den einzelnen Subpopulationen einer Hoch - bzw. Runterregulation unterliegen. Weiterhin ist im Vergleich zu Abb. 23 erneut auffallend, dass R2 keine signifikante Abweichung der Expression im Verhältnis zur Gesamtpopulation aufweist, bis auf Protein 1. Jedoch liegen nahezu alle Proteine des TCA - Zyklus in R2 leicht erhöht exprimiert im Vergleich zur Gesamtpopulation vor. Außerdem lässt das Expressionsmuster von R3 einen analogen Trend zu Abb. 23 erkennen, d.h. fast alle Proteine liegen runterreguliert vor. Die Subpopulation R1 hingegen zeigt erneut hoch - und runterregulierte Proteine. Betrachtet man Protein 1, so zeigt sich in R1, R2 und R3 eine schwächere Expression im Verhältnis zur Gesamtpopulation. Es handelt sich hierbei um die Isocitratdehydrogenase, welche Isocitrat zu 2 - Oxoglutarat transformiert. [66] Dieses Zwischenprodukt des TCA - Zyklus dient, wie

eingangs erwähnt, als Kosubstrat für die Biotransformation von L - Prolin zu trans - 4 - Hydroxy - L - prolin. Weiterhin kommt die heterogene Expression zwischen den drei Subpopulationen, wie bereits beim Zellzyklus erwähnt, an den Proteinen 12 - 15 zum Ausdruck. So katalysiert bspw. die Fumarathydratase (Protein 13) unter Wasseranlagerung die Reaktion von Fumarat zu Malat, wohingegen durch die Malatsynthase (Protein 14) Glyoxylat und Acetyl - CoA zu Malat und Coenzym - A umgesetzt wird. [66] Protein 1 und 14 sind Schlüsselenzyme des TCA - Zyklus. [66]

In Abb. 25 sind zwei an der Prolinbiosynthese beteiligte Proteine in R1, R2 und R3 gegenübergestellt. Dabei wird ausschließlich eine Runterregulation der 4 - Glutamyl - Phosphat - Reduktase in R1 erkennbar, welche den zweiten Schritt der Prolinbiosynthese aus Glutamat katalysiert. Hierbei wird das zuvor gebildete 4 - Glutamyl - Phosphat zu Glutamat -  $\gamma$  - semialdehyd reduziert. [67] Vermutlich synthetisieren die Zellen aus R1 eine geringere Menge an Prolin, als die der Subpopulationen R2 und R3. Da jedoch das Prolin dem Medium zugesetzt wird, hat dies keinen erheblichen Einfluss auf die Ausbeute an trans - 4 - Hydroxy - L - prolin. Das Protein PutA, welches wie eingangs erwähnt Prolin zu Glutamat metabolisiert, wurde nicht detektiert, da das entsprechende Gen in diesem Stamm deletiert wurde.



Das Dritte Protein der Prolinbiosynthese, die Pyrrolincarboxylat - Reduktase, wurde nicht identifiziert.

**Abbildung 25: Vergleich der Proteine der Prolinbiosynthese, HK3.**  
 1: 4 - Glutamyl - Phosphat - Reduktase (gi 110640479), 2:  $\gamma$  - Glutamat - Kinase (gi 110640478)

Schließlich sind in Abb. 26 ausgewählte Proteine der Stressantwort graphisch dargestellt.

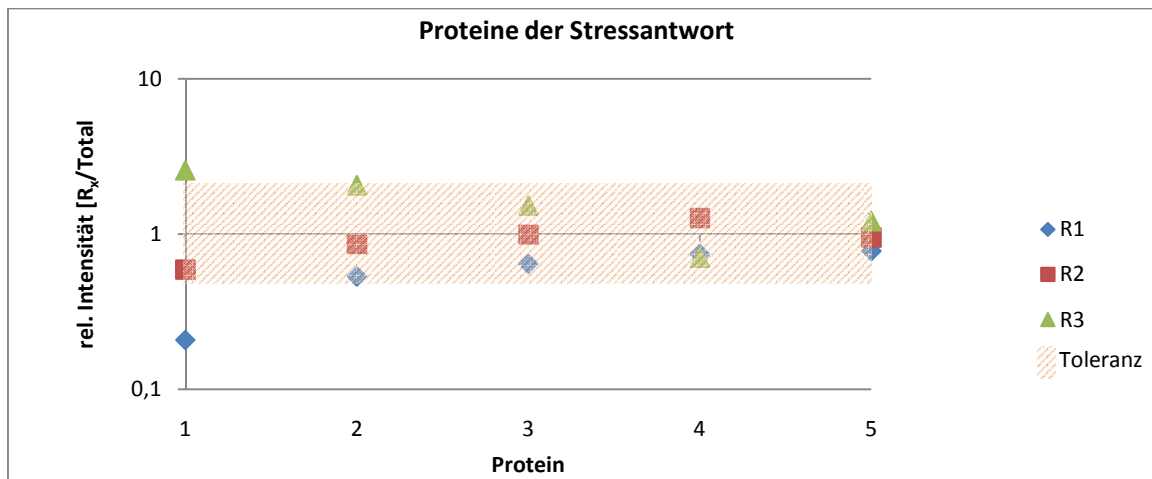


Abbildung 26: Vergleich der Proteine der Stressantwort, HK3. 1: Hitzeschockprotein IbpA (gi 110644030), 2: Chaperon - protein HscA (gi 110642691), 3: Chaperonprotein DnaK (gi 110640227), 4: Transkription - Elongationsprotein NusA (gi 157162654), 5: Chaperonprotein DnaJ (gi 16128009)

In obiger Abbildung ist zu erkennen, dass ausschließlich IbpA einer Regulation unterliegt. Während man in R1 eine niedrigere Quantität dieses Proteins findet, herrscht in den Zellen von R3 eine Hochregulation dieses Proteins im Verhältnis zur Gesamtpopulation. Da IbpA, wie bereits erwähnt, an „inclusion bodies“ bindet – die bspw. im Laufe einer heterologen Überexpression entstanden sind – [61], kann die Vermutung dieser in R3 bestärkt werden. Es sei zu erwähnen, dass IbpA/B ausschließlich im Zusammenhang mit Chaperonen wie DnaJ, DnaK und GrpE in der Lage sind, „inclusion bodies“ bzw. fehlgefaltete Proteine rückzufalten. [69] Außerdem ist nicht genau geklärt, ob sich IbpA/B im Laufe des Aggregationsprozesses oder im Nachhinein in den „inclusion bodies“ ansammeln. [70] Weiterhin können diese Hitzeschockproteine eine Bildung dieser Proteinaggregate nicht verhindern. [70]

### 3.3.2 Der Stamm pEKE-hyp1

Die sortierten Proben der HK6 wurden zweifach gemessen, um einen sicheren Datensatz zu erhalten. Hierbei handelte es sich um Proben, die einige Monate fixiert gelagert wurden. Da jedoch bereits der Einfluss der Zellfixierung und Lagerung auf das Proteom untersucht wurde, kann angenommen werden, dass keine signifikanten Proteolysen stattgefunden haben. [31]

Zunächst soll die Hyp1 - Menge in den einzelnen Subpopulationen R1 - R4 analog 3.3.1.2 dargestellt werden. Dazu wurden die Quantitätswerte von Hyp1 ins Verhältnis zur Gesamtpopulation gesetzt und in Abb. 27 graphisch dargestellt. Abbildung 28 hingegen stellt die Menge des rekombinanten Proteins je Zelle dar. Hierfür erfolgte die Division der Intensitäten durch die eingesetzte Zellzahl der entsprechenden Subpopulation.

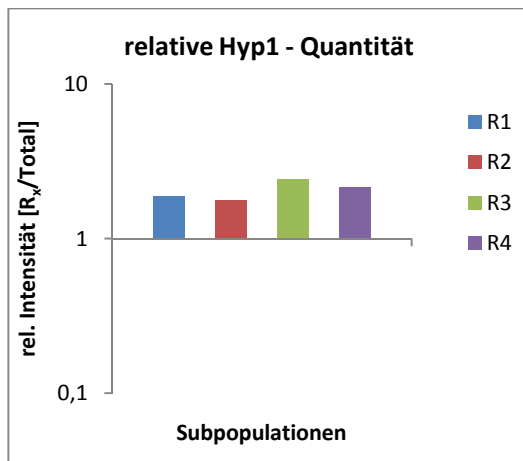


Abbildung 27: relative Hyp1 - Quantität, HK6

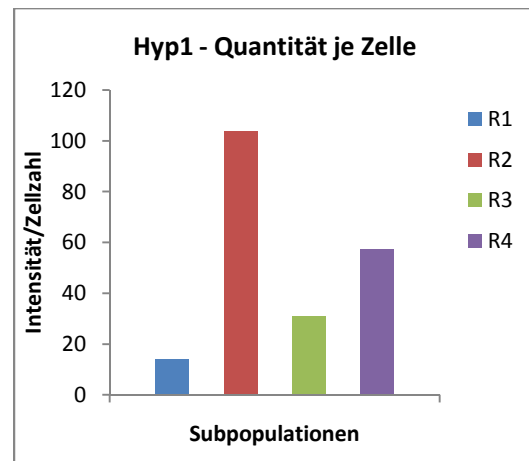
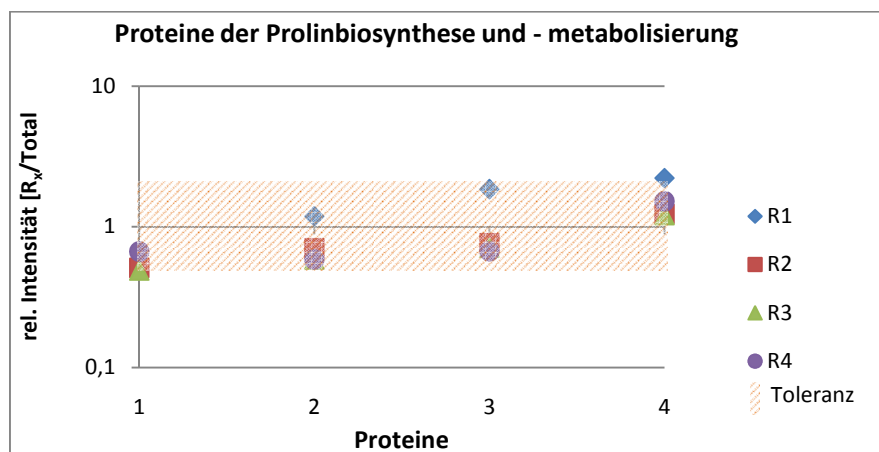


Abbildung 28: Hyp1 - Quantität je Zelle

Betrachtet man die beiden Abbildungen, so kann man sehr unterschiedliche Rückschlüsse ziehen. Während man in Abb. 27 davon ausgeht, dass R3 die größte Hyp1 - Quantität liefert, findet man in Abb. 28 die größte Menge je Zelle in R2. Außerdem erkennt man in Abb. 27, dass alle der vier Subpopulationen eine annähernd gleich hohe Hyp1 - Expression aufweisen, die in Relation zur Gesamtprobe den Wert „1“ übersteigen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte an der hohen Abweichung zwischen den eingesetzten Zellzahlen der Subpopulationen liegen. Außerdem wurden für die Analyse der Subpopulation R2 nur  $0,33 \cdot 10^6$  Zellen sortiert, jedoch bezieht sich das verwendete Protokoll [48] auf eine Zellzahl von  $5 \cdot 10^6$ . So standen nur 7 % der optimalen Zellzahl und damit auch sehr wenig Protein zur Messung bereit. Dem entsprechend sinkt die Zuverlässigkeit der quantitativen Expressionsdaten. Des Weiteren wurde bereits erwähnt, dass es sich um Proben handelte, die bereits einige Monate fixiert gelagert wurden. Zwar wurden keine signifikanten Proteolysen angenommen [31], jedoch stellte sich heraus, dass in  $\text{NaN}_3$  - fixierten Zellen der Abbau von Proteinen im Vergleich zu gefrorenen Zellen ( $-80^\circ\text{C}$ ) höher ist (persönliche Mitteilung Michael Jahn). Daraus wird ersichtlich, dass sich bei diesen Proben eine quantitative Auswertung kritisch gestaltet.

Ein funktionelles Clustering mittels DAVID erfolgte analog 3.3.1.2. Die Darstellungen der Proteine des Zellzyklus, TCA - Zyklus und der Stressantwort sind unter Anlagen (Teil 2) zu finden, da im Rahmen dieser Arbeit nicht noch einmal explizit darauf eingegangen wird. Im Vergleich zu dem Expressionstamm *putA\_pEKE-hyp1* wurden jedoch zum Teil andere Proteine detektiert. Erwähnenswert sei weiterhin im Vergleich zu *putA\_pEKE-hyp1*, dass die Proteine des Zell - und TCA - Zyklus in den einzelnen Subpopulationen schwächeren Regulationen unterlagen. Bezüglich der Stressantwort konnte die Bildung von „inclusion bodies“ in den Subpopulationen mit hohen SSC/FSC - Signalen (R3, R4) nicht auf eine hochregulierte Expression von IbpA bezogen werden. Jedoch wird die Bildung unlöslicher Proteinaggregate in diesen Zellen ebenfalls vermutet.

In Abb. 29 sind die drei Proteine der Prolinbiosynthese (1, 2, 4) und das Protein des Proteinmetabolismus (3) für den Stamm pEKE-*hyp1* dargestellt. Da im Stamm *putA\_pEKE-hyp1* eine Deletion des Gens zur Expression von PutA vorgenommen wurde, erfolgte keine Verstoffwechselung von Prolin. Jedoch ist der Stamm pEKE-*hyp1* in der Lage, L - Prolin als zusätzliche Energiequelle zu nutzen. Als hoch - bzw. runterreguliert werden ausschließlich die Proteine betrachtet, die um einen Faktor „ $\geq 2$ “ bzw. „ $\leq 0,5$ “ abweichen.



**Abbildung 29: Proteine der Prolinmetabolisierung und - biosynthese, HK6. 1: 4 - Glutamyl - Phosphat - Reduktase (gi 110640479), 2: Pyrrolincarboxylat - Reduktase (gi 157159905), 3: Bifunktionelles Protein PutA (gi 16128980), 4:  $\gamma$  - Glutamat - Kinase (gi 110640478)**

In Abb. 29 wird deutlich, dass die dargestellten Proteine in den einzelnen Subpopulationen kaum einer Hoch - bzw. Runterregulation unterliegen. Jedoch unterliegt die 4 - Glutamyl - Phosphat - Reduktase in allen der vier Subpopulationen einer Runterregulation, die jedoch in R3 am signifikantesten ist. Wie bereits beim Stamm *putA\_pEKE-hyp1* erwähnt, katalysiert dieses Protein die zweite Reaktion in der Prolinbiosynthese. Im Gegensatz dazu findet man in R1 eine erhöhte Expression des Proteins 4. Die  $\gamma$  - Glutamat - Kinase ist für den ersten Schritt in der Prolinbiosynthese verantwortlich, so katalysiert dieses Protein die ATP - abhängige Umsetzung von Glutamat zu 4 - Glutamyl - Phosphat. [67]

## 4 Zusammenfassung

Um einen biotechnologischen Prozess zu optimieren, bedarf es einer genauesten Charakterisierung der Zellpopulation. So sollte die Verknüpfung der Flowzytometrie mit einer Proteomanalyse detaillierte Einblicke in den Bioprozess liefern.

Es konnte zunächst durch zwei parallele Wachstumskurven des Stammes *putA\_pEKE-hyp1* geschlussfolgert werden, dass trotz langer und stabiler Kultivierungsbedingungen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten besteht. Bei der Analyse der Hyp1 - Expression dieser beiden HK konnte eine erfolgreiche Induktion und Expression unter IPTG - Zugabe festgestellt werden. Weiterhin fand eine variierende heterologe Proteinexpression in den unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus statt.

Zusätzlich wurde der Stamm *putA\_pEKE-hyp1* einer veränderten Kultivierung ausgesetzt, sodass eine bewusste Aufspaltung der Population erreicht wurde. Für das Entstehen dieser flowzytometrisch detektierten Subpopulationen wurde die Bildung von „*inclusion bodies*“ in Betracht gezogen. Diese Vermutung konnte durch eine Hoch - bzw. Runterregulation der IbpA - und Hyp1 - Expression in den einzelnen Subpopulationen bestärkt werden.

Neben den Subpopulationen von *putA\_pEKE-hyp1* wurden ebenfalls die des Stammes *pEKE-hyp1* in Hinsicht auf die Hyp1 - Menge untersucht. Dabei konnten erneut unterschiedlich hohe Expressionen des rekombinanten Proteins festgestellt werden. Die Anwesenheit von „*inclusion bodies*“ konnte in diesem Falle nicht auf eine Hochregulation von IbpA in den Subpopulationen mit hohen SSC - Signalen gestützt werden. Andererseits lag dieses Hitzeschockprotein in den Subpopulationen mit niedrigeren Streulichtsignalen stark runterreguliert vor.

Bei der Analyse weiterer Proteine der beiden *hyp1* - tragenden Stämme sollte den Charakteristika der Subpopulationen und dem Entstehen nachgegangen werden. Dabei konnten besonders im Stamm *putA\_pEKE-hyp1* bezüglich der einzelnen Subpopulationen unterschiedliche Proteinexpressionen des Zell - und TCA - Zyklus identifiziert werden.



# Literatur

- [1] Gavrilescu, M.; Chisti, Y.: Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. In: Biotechnology Advances – 23 (2005) – S. 471 - 499
- [2] Lorenz, P.; Zinke, H.: White biotechnology: differences in US and EU approaches?. In: TRENDS in Biotechnology – 23 (2005) – S. 570 - 574
- [3] Frazzetto, G.: White biotechnology. In: EMBO reports – 4 (2003) – S. 835 - 837
- [4] Straathof, A. JJ; Panke, S.; Schmid, A.: The production of fine chemicals by biotransformations. In: Current Opinion in Biotechnology – 13 (2002) – S. 548 - 556
- [5] Chen, Z.; Wilmanns, M.; Zeng, A. - P.: Structural synthetic biotechnology: from molecular structure to predictable design for industrial strain development. In: TRENDS in Biotechnology – 28 (2010) – S. 534 - 542
- [6] Krämer, I.; Jelkmann, W.: Rekombinante Arzneimittel. Medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2008
- [7] Baba T.; Ara T.; Hasegawa M.; Takai Y.: Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single - gene knockout mutants: the Keio collection. In: Molecular Systems Biology – 2 (2006) – S. 1 - 11
- [8] Clark, D. P.; Pazdernik, N. J.: Biotechnology – Applying the Genetic Revolution. Elsevier Academic Press, Burlington, USA, 2009
- [9] Rai, M.; Padh, H.: Expression systems for production of heterologous proteins. In: Current Science – 80 (2001) – S. 1121 - 1128
- [10] Schlegel, H. G.: Allgemeine Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart, Deutschland, 2007, 8. Auflage
- [11] Baneyx, F.: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. In: Current Opinion in Biotechnology – 10 (1999) – S. 411 - 421
- [12] Gilleßen, B.: Rekombinante Biosynthese amino - substituierter Phenylpropanoide in *E. coli*. 2009
- [13] Datsenko, K. A.; Wanner B. L.: One - step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. In: PNAS - 97 (2000) – S. 6640 - 6645

- [14] Eikmanns, B. J.; Kleinertz, E.; Liebl, W.; et al.: A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. In: Gene – 102 (1991) – S. 93 - 98
- [15] De Bellis, D.; Schwarz, I.: Regulated expression of foreign genes fused to lac: control by glucose levels in growth medium. In: Nucleic Acids Research – 18 (1990) – S. 1311
- [16] Shibasaki, T.; Mori, H.; Ozaki, A.: Enzymatic production of *trans*-4-hydroxy-L-proline by Regio- and Stereospecific Hydroxylation of L-Proline. In: Bioscience, Biotechnology and Biochemistry – 64 (2000) – S. 746 - 750
- [17] Baban, B. A.; Vinod, M. P.; Tanner, J. J.; et al.: Probing a hydrogen bond pair and the FAD redox properties in the proline dehydrogenase domain of *Escherichia coli* PutA. In: Biochimica et Biophysica Acta – 1701 (2004) – S. 49 - 59
- [18] Zhang, M.; White, T. A.; Schuermann, J. P.; et al.: Structures of the *Escherichia coli* PutA Proline Dehydrogenase Domain in Complex with Competitive Inhibitors. In: Biochemistry – 43 (2004) – S. 12539 - 12548
- [19] Lee, Y. - H.; Nadaraia, S.; Gu, D.; et al.: Structure of the proline dehydrogenase domain of the multifunctional PutA flavoprotein. In: Nature – 10 (2003) – S. 109 - 114
- [20] Schmid, R. D.: Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley - VCH, Weinheim, Deutschland, 2002, 2. Auflage
- [21] Grogan, G.: Practical Biotransformations: A Beginner's Guide. Wiley - Blackwell, Oxford, 2009
- [22] Fessner, W. D.; Anthonsen, T.: Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions. Wiley - VCH, Weinheim, 2008
- [23] Kieslich, K.; van der Beek, C. P.; de Bont, J. A. M.; et al.: New frontiers in screening for microbial biocatalysts. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 1998
- [24] Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; et al.: Industrial biocatalysis today and tomorrow. In: Nature – 409 (2001) – S. 258 - 268
- [25] Lawrence, C. C.; Sobey, W. J.; Field, R. A.; et al.: Purification and initial characterization of proline 4-hydroxylase from *Streptomyces griseoviridis* P8648: a 2-oxoacid, ferrous-dependent dioxygenase involved in etamycin biosynthesis. In: Biochemical Journal – 313 (1996) – S. 185 - 192

- [26] Shibasaki, T.; Mori, H.; Chiba, S.; et al.: Microbial Proline 4-Hydroxylase Screening and Gene Cloning. In: Applied and Environmental Microbiology – 65 (1999) – S. 4028 - 4031
- [27] Bugg, T. D. H.: Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. In: Tetrahedron – 59 (2003) – S. 7075 - 7101
- [28] Hara, R.; Kino, K.: Characterization of novel 2-oxoglutarate dependent dioxygenases converting L-proline to cis-4-hydroxy-L-proline. In: Biochemical and Biophysical Research Communications – 379 (2009) – S. 882 - 886
- [29] Simon, H.; Bader, J.; Günther, H.; et al.: Chiral Compounds Synthesized by Biocatalytic Reductions. In: Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 24 (1985) – S. 539 - 553
- [30] Müller, S.; Harms, H.; Bley, T.: Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. In: Current Opinion in Biotechnology – 21 (2010) – S. 100 - 113
- [31] Wiacek, C: Cytomics: Strategien von *Cupriavidus necator* JMP134 beim Umgang mit dem toxischen Substrat Phenol. 2007
- [32] Bridson, E. Y.; Gould, G. W.: Quantal microbiology. In: Letters in Applied Microbiology – 30 (2000) – S. 95 - 98
- [33] Schweder, T.; Krüger, E.; Xu, B.; et al.: Monitoring of Genes That Respond to Process-Related Stress in Large-Scale Bioprocesses. In: Biotechnology and Bioengineering – 65 (1999) – S. 151 - 159
- [34] Cooper, S.: Bacterial Growth and Division. Biochemistry and Regulation of Prokaryotic and Eukaryotic Division Cycles. Academic Press, San Diego, Californien, 1991
- [35] Brehm - Stecher, B. F.; Johnson, E. A.: Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews – 68 (2004) – S. 538 - 559
- [36] Diaz, M.; Herrero, M.; Garcia, L. A., et al.: Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. In: Biochemical Engineering Journal – 48 (2010) – S. 385 - 407
- [37] Shapiro, H. M.: Practical Flow Cytometry. Wiley, Hoboken, New Jersey, 2003, 4. Auflage
- [38] Hawley, T. S.; Hawley, R. G.: Methods in Molecular Biology - Flow Cytometry Protocols. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2004, 2. Auflage
- [39] Westermeier, R.; Naven, T.; Höpker, H. R.: Proteomics in practice: a guide to successful experimental design. Wiley - VCH, Weinheim, 2008, 2. Auflage

- [40] Aebersold, R.; Mann, M.: Mass spectrometry-based proteomics. In: Nature – 422 (2003) – S. 198 - 207
- [41] Schmidt, A.: ICPL – Eine *High-Throughput*-Methode für die quantitative Proteomanalytik. 2006
- [42] Link, A. J.; Eng, J.; Schieltz, D. M.; et al.: Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. In: Nature – 17 (1999) – S. 676 - 682
- [43] Pifat - Mrzljak, G.: Supramolecular Structure and Function 7. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York, 2001
- [44] de Hoffmann, E.; Stroobant, V.: Mass Spectrometry Principles and Applications. John Wiley & Sons Ltd , Chichester, England, 2007, 3. Auflage
- [45] Fenn, J. B.: Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How It All Began. In: Journal of Biomolecular Techniques – 13 (2002) – S. 101 – 118
- [46] Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A.: Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. In: Nature Protocols – 4 (2009) – S. 44 - 57
- [47] Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A.: Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. In: Nucleic Acids Research – 37 (2009) – S. 1 - 13
- [48] Jehmlich, N.; Hübschmann, T.; Salazar, M. G.; et al.: Advanced tool for characterization of microbial cultures by combining cytomics and proteomics. In: Applied Microbiology and Biotechnology – 88 (2010) – S. 575 – 584
- [49] Pappin, D. J. C.; Hojrup, P.; Bleasby, A. J.: Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. In: Current Opinion in Biotechnology – 3 (1993) – S. 327 - 332
- [50] Cox, J.; Mann, M.: MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. In: Nature – 26 (2008) – S. 1367 - 1372
- [51] Sträuber, H.; Müller, S.: Viability States of Bacteria - Specific Mechanisms of Selected Probes. In: Cytometry Part A – 77A (2010) – S. 623 - 634

- [52] Mason, D. J.; Lopéz - Amorós, R.; Allman, R.; et al.: The ability of membrane potential dyes and calcafluor white to distinguish between viable and non - viable bacteria. In: Journal of Applied Microbiology – 78 (1995) – S. 309 - 315
- [53] Monfort, P.; Baleux, B.: Cell cycle characteristics and changes in membrane potential during growth of *Escherichia coli* as determined by a cyanine fluorescent dye and flow cytometry. In: Journal of Microbiological Methods – 25 (1996) – S. 79 - 86
- [54] Diaper, J. P.; Tither, K.; Edwards, C.: Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. In: Applied Microbiology and Biotechnology – 38 (1992) – S. 268 - 272
- [55] Müller, S.; Loffhagen, N.; Bley, T.; et al.: Membrane-potential-related fluorescence intensity indicates bacterial injury. In: Microbiological Research – 151 (1996) – S. 127 - 131
- [56] Novo, D.; Perlmutter, N. G.; Hunt, R. H.; et al.: Accurate Flow Cytometric Membrane Potential Measurement In Bacteria Using Diethyloxacarbocyanine and a Ratiometric Technique. In: Cytometry – 35 (1999) – S. 55 - 63
- [57] Müller, S.; Nebe - von - Caron, G.: Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. In: FEMS – 34 (2010) – S. 554 - 587
- [58] Baneyx, F.; Mujacic, M.: Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. In: Nature – 22 (2004) – S. 1399 - 1408
- [59] Grosche, L.: Physiologische Charakterisierung von gentechnisch veränderten Stämmen. 2011
- [60] Schumann, W.; Ferreira, L. C. S.: Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. In: Genetics and Molecular Biology – 27 (2004) – S. 442 – 453
- [61] Kuczyńska - Wiśnik, D.; Żurawa - Janicka, D.; Narkiewicz, J.; et al.: *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA/B enhance activity of enzymes sequestered in inclusion bodies. In: Acta Biochimica Polonica – 51 (2004) – S. 925 - 931
- [62] Sawitzke, J. A.; Austin, S.: Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* muk mutants by mutations in topoisomerase I. In: PNAS – 97 (2000) – S. 1671 - 1676
- [63] Müller, S.; Babel, W.: Analysis of bacterial DNA patterns—an approach for controlling biotechnological processes. In: Journal of Microbiological Methods – 55 (2003) – S. 851 - 858

- [64] Weiss, D. S.: Bacterial cell division and the septal ring. In: Molecular Microbiology – 54 (2004) – S. 588 - 597
- [65] Arends, S. J. R.; Williams, K.; Scott, R. J.; et al.: Discovery and Characterization of Three New *Escherichia coli* Septal Ring Proteins That Contain a SPOR Domain: DamX, DedD, and RlpA. In: Journal of Bacteriology – 192 (2010) – S. 242 - 255
- [66] Madigan, M. T.; Martinko, J. M.: Brock Mikrobiologie. Pearson Education Deutschland GmbH, München, Deutschland, 2006, 11. überarbeitete Auflage
- [67] Ley, O. A.: Charakterisierung der Regulation des Prolinbiosyntheseweges in *Corynebacterium glutamicum*. 2005
- [68] Laskowska, E.; Wawrzynów, A.; Taylor, A.: IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. In: Biochimie – 78 (1996) – S. 117 - 122
- [69] Ha, L. T.: Optimisation of active recombinant protein production, exploring the impact of small heat-shock proteins of *Escherichia coli*, IbpA and IbpB, on in vivo reactivation of *inclusion bodies*. 2005
- [70] Carrió, M. M.; Villaverde, A.: Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. In: Journal of Biotechnology – 96 (2002) – S. 3 - 12

# Anlagen

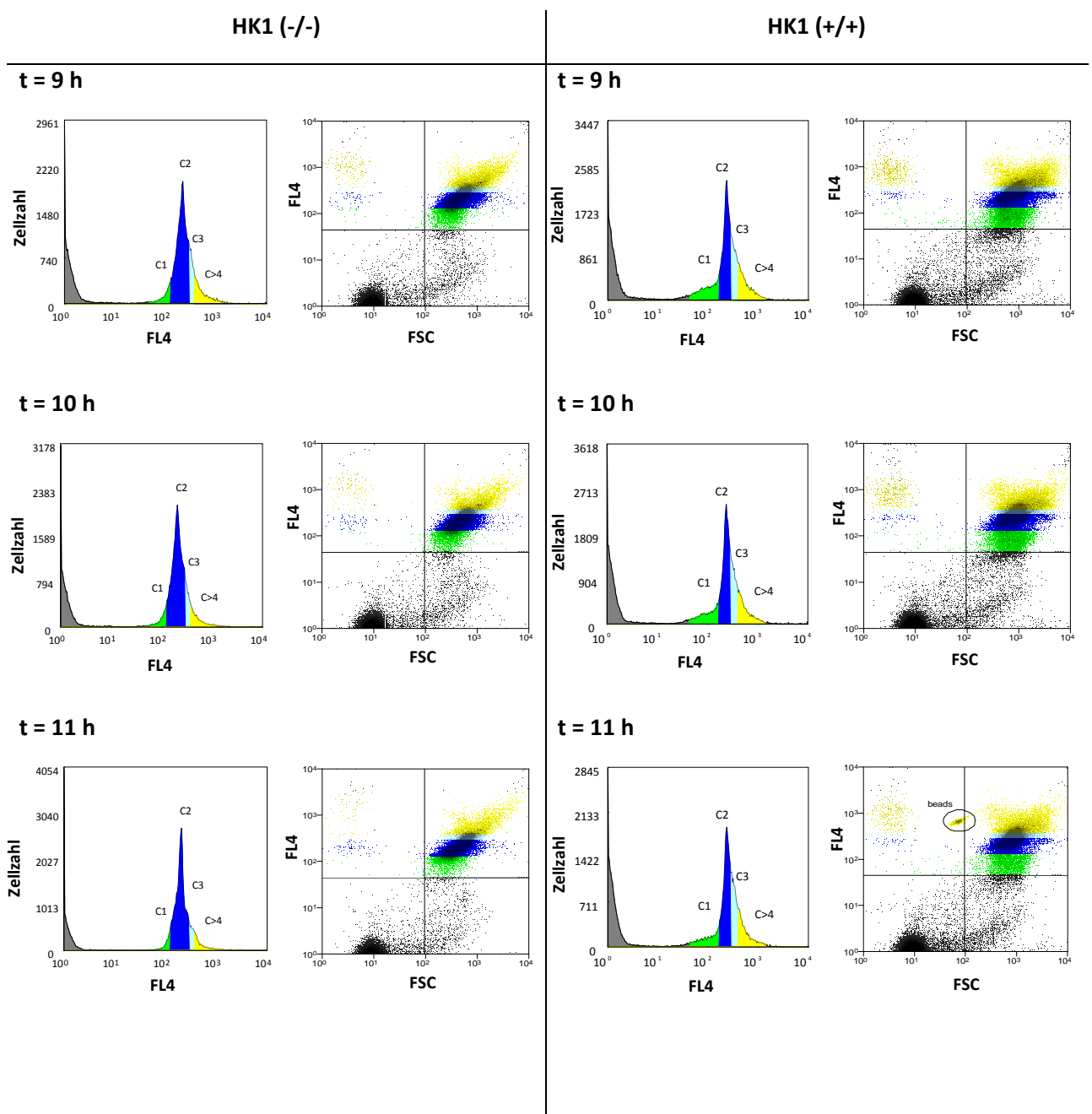
Teil 1 .....	A - 1
Teil 2 .....	A - 17

# Anlagen, Teil 1

Alle flowzytometrischen Messungen wurden im logarithmischen Modus aufgenommen.

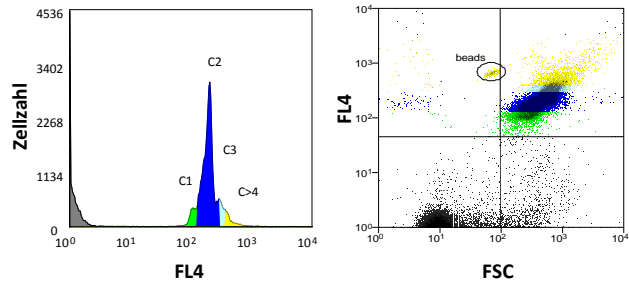
## siehe 3.2.1.1 DAPI - Färbung

In den folgenden Abbildungen wird die DNA Verteilung zum Einen einparametrisch und zum Anderen zweiparametrisch gegen das FSC dargestellt. Hierbei wurde anhand der in den Histogrammen ermittelten *Mean* - Werte eine Gatesetzung vorgenommen und farbig gekennzeichnet.

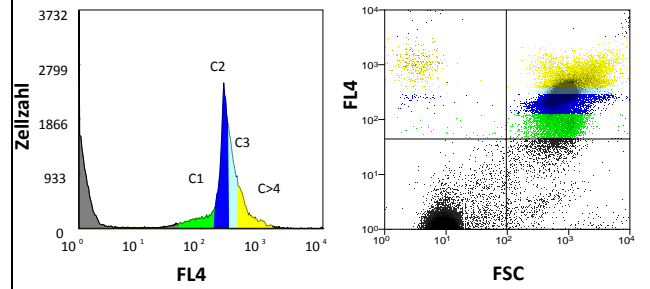




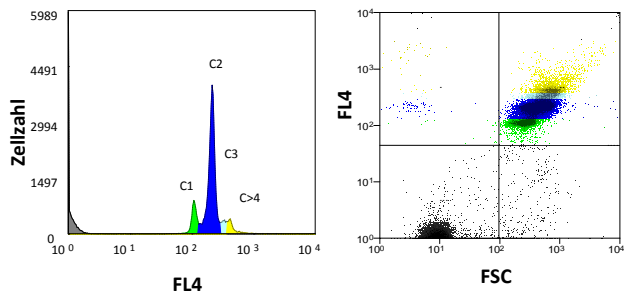
**t = 12 h**



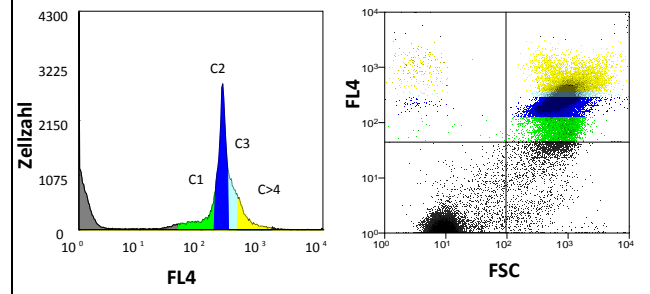
**t = 12 h**



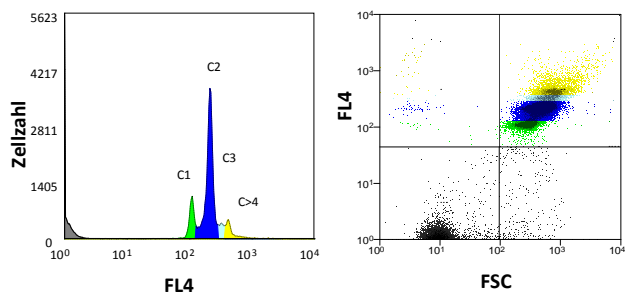
**t = 14 h**



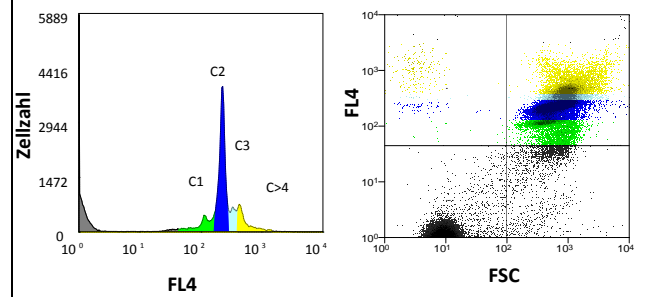
**t = 14 h**

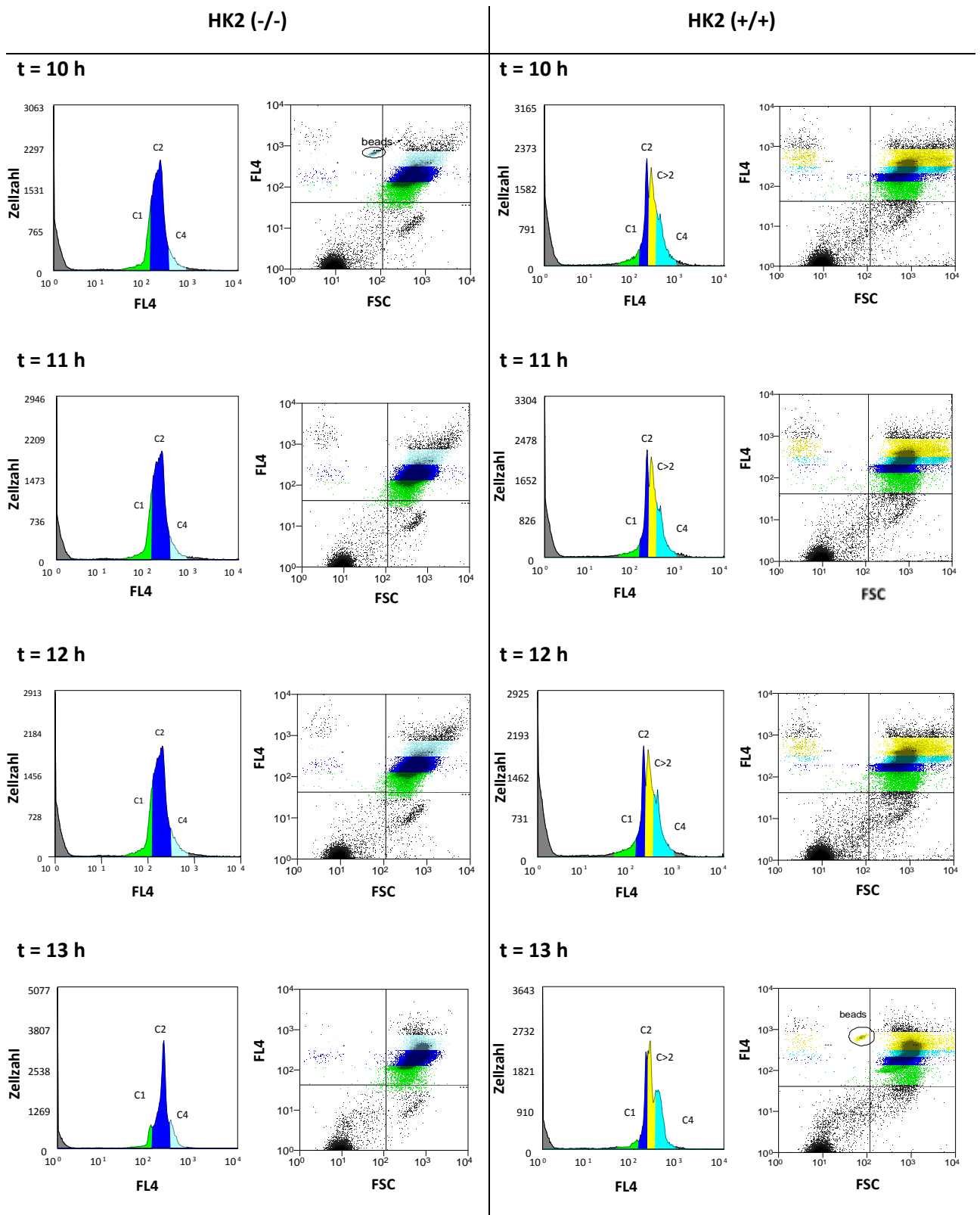


**t = 16 h**

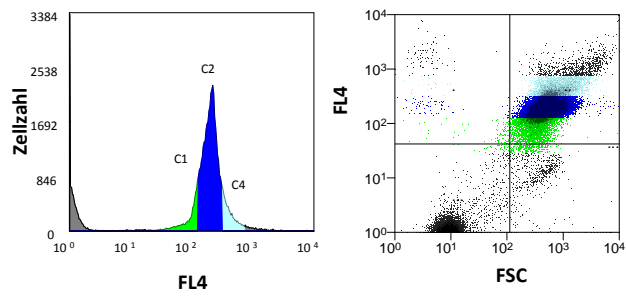


**t = 16 h**

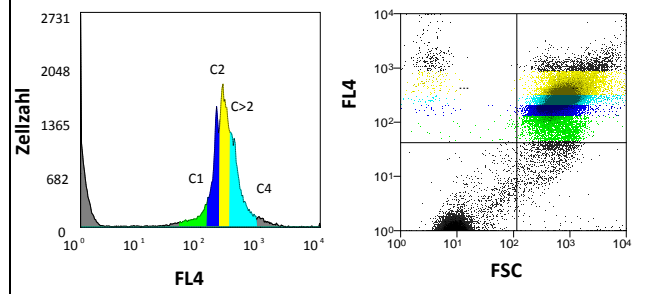




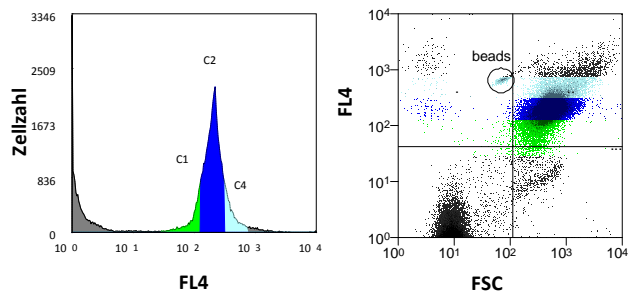
**t = 14 h**



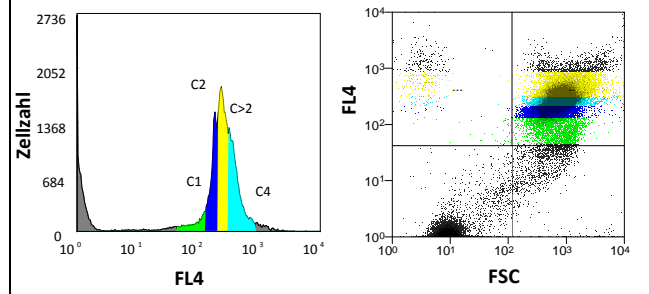
**t = 14 h**



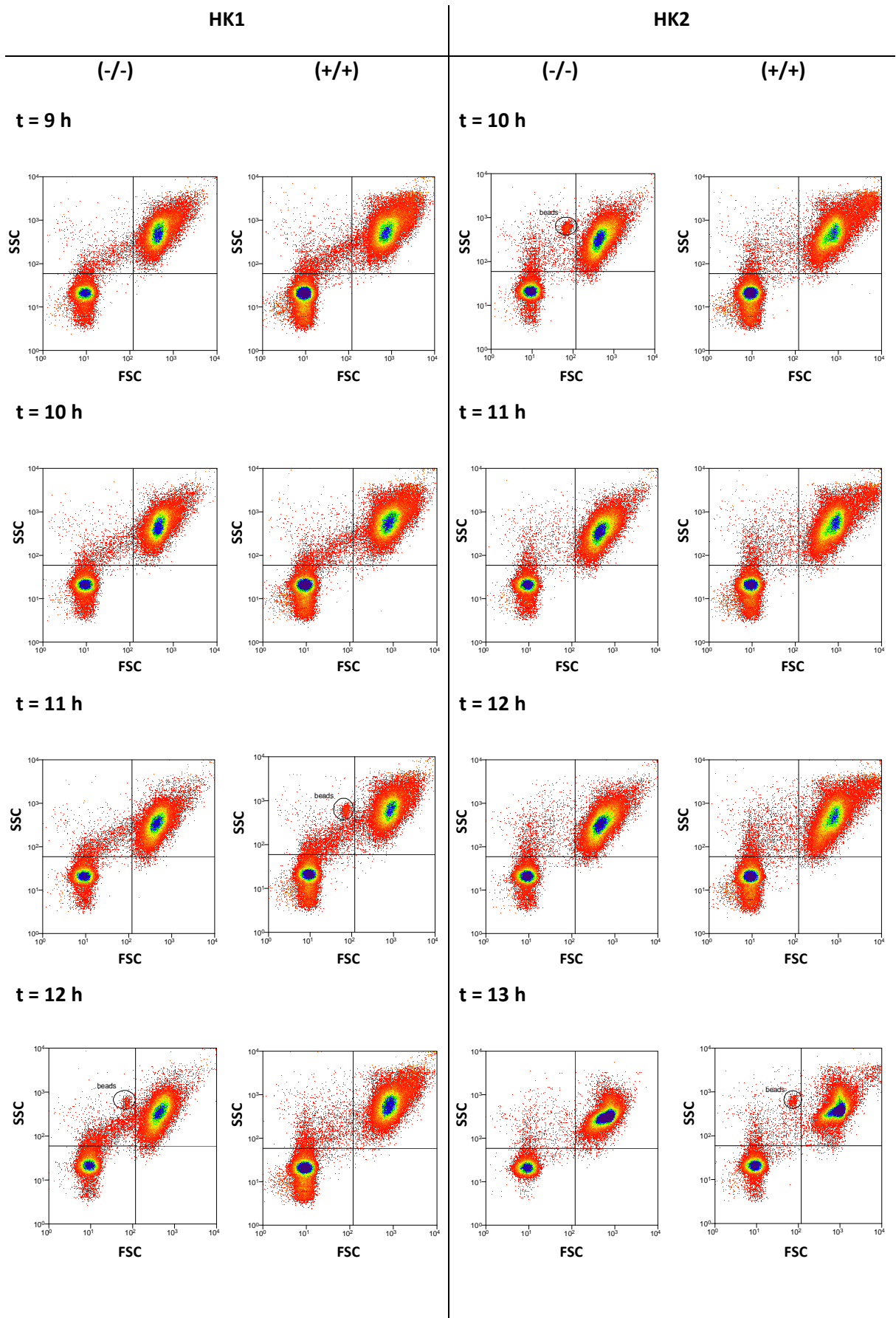
**t = 16 h**



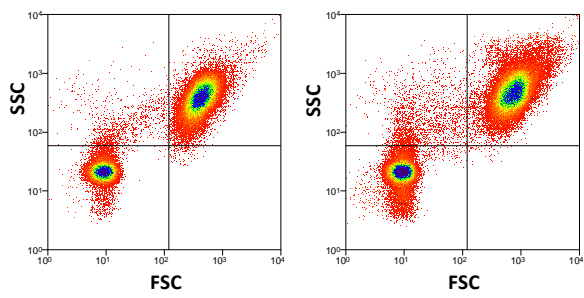
**t = 16 h**



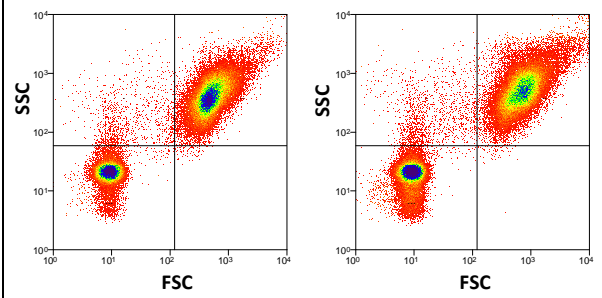
siehe 3.2.1.2 Morphologische Eigenschaften



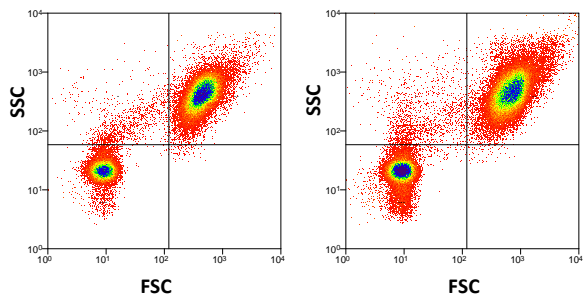
**t = 14 h**



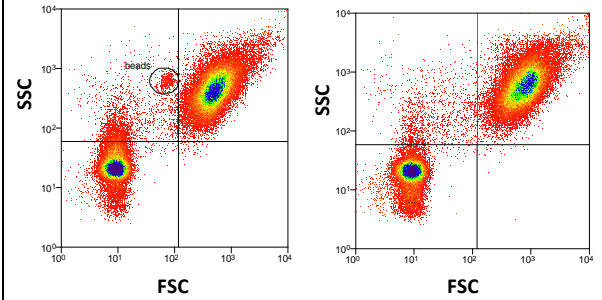
**t = 14 h**



**t = 16 h**



**t = 16 h**

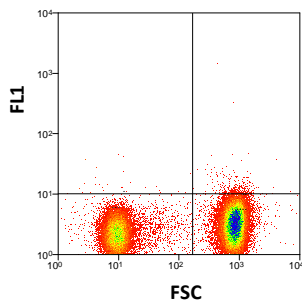


### siehe 3.2.1.3 Membranpotentialbestimmung

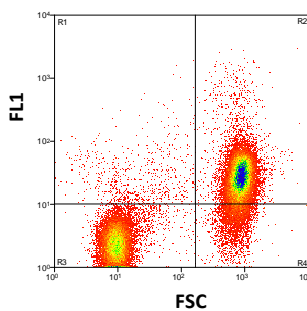
Zunächst werden die Daten zur Ermittlung der Farbstoffkonzentration dargestellt.

Für die Ermittlung der *Mean* - Werte wurden nur die Ereignisse im rechten oberen Quadranten beachtet, da ungefärbte Zellen und Rauschsignale ausgeschlossen werden müssen.

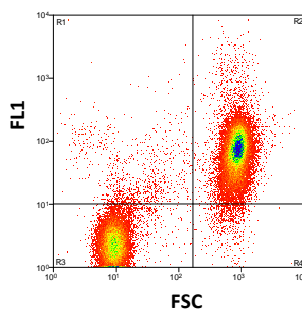
**c = 0 nM**



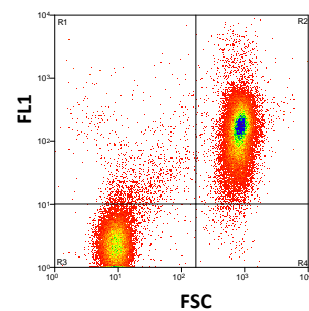
**c = 10 nM**



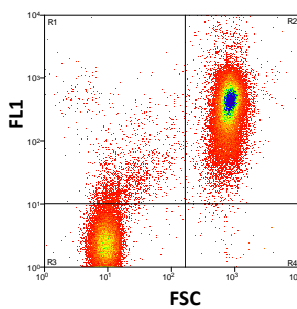
**c = 25 nM**



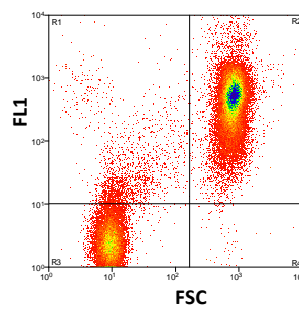
**c = 50 nM**



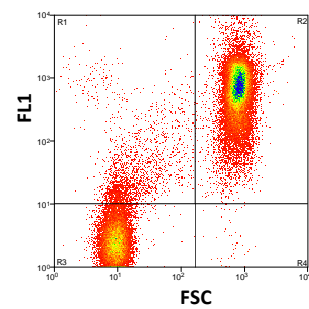
**c = 100 nM**



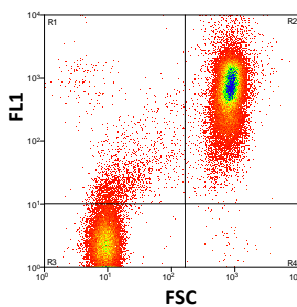
**c = 150 nM**



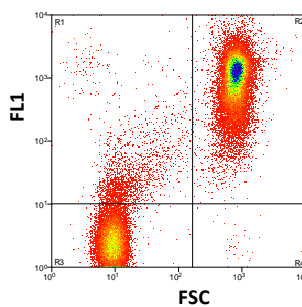
**c = 200 nM**



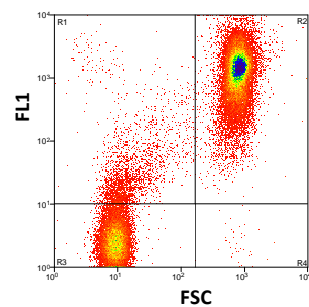
**c = 250 nM**



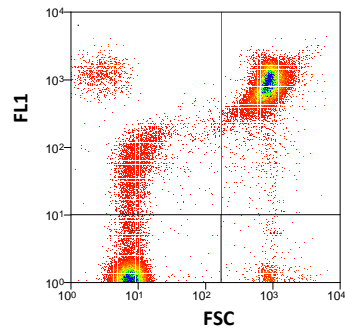
**c = 350 nM**



**c = 500 nM**

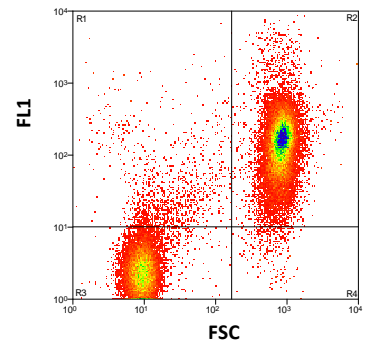


**70 °C behandelte Zellen (t = 10 min),  $c_{\text{End}} = 50 \text{ nM}$**



→ *Mean* - Wert: 903, 47

**bei RT behandelte Zellen,  $c_{\text{End}} = 50 \text{ nM}$**

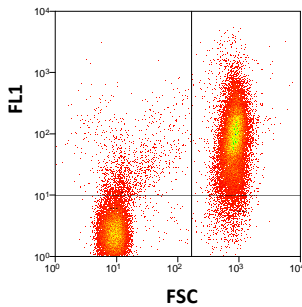


→ *Mean* - Wert: 197, 86

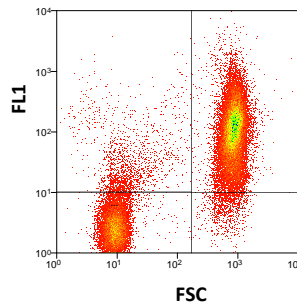
An den beiden Dotplots und den dazugehörigen *Mean* - Werten kann man deutlich erkennen, dass die hitzebehandelten Zellen eine um ein Vielfaches höhere FL1 aufweisen, als die bei RT - gelagerten Zellen. Dabei kann eine unspezifische Färbung, bspw. zellulärer Lipide, gezeigt werden.

Folgend sind die Daten zur Ermittlung der Inkubationszeit dargestellt.

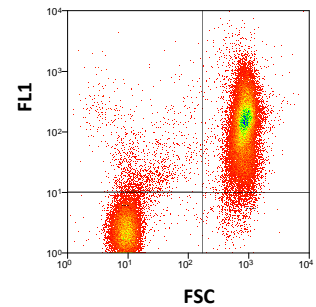
**t = 2,5 min**



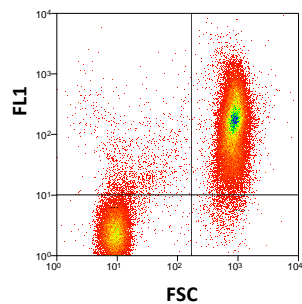
**t = 5 min**



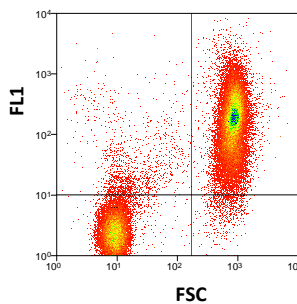
**t = 7,5 min**



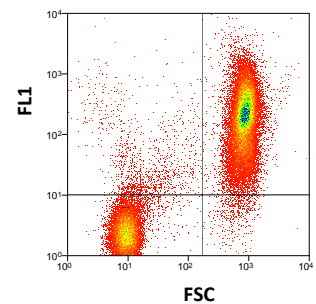
**t = 10 min**

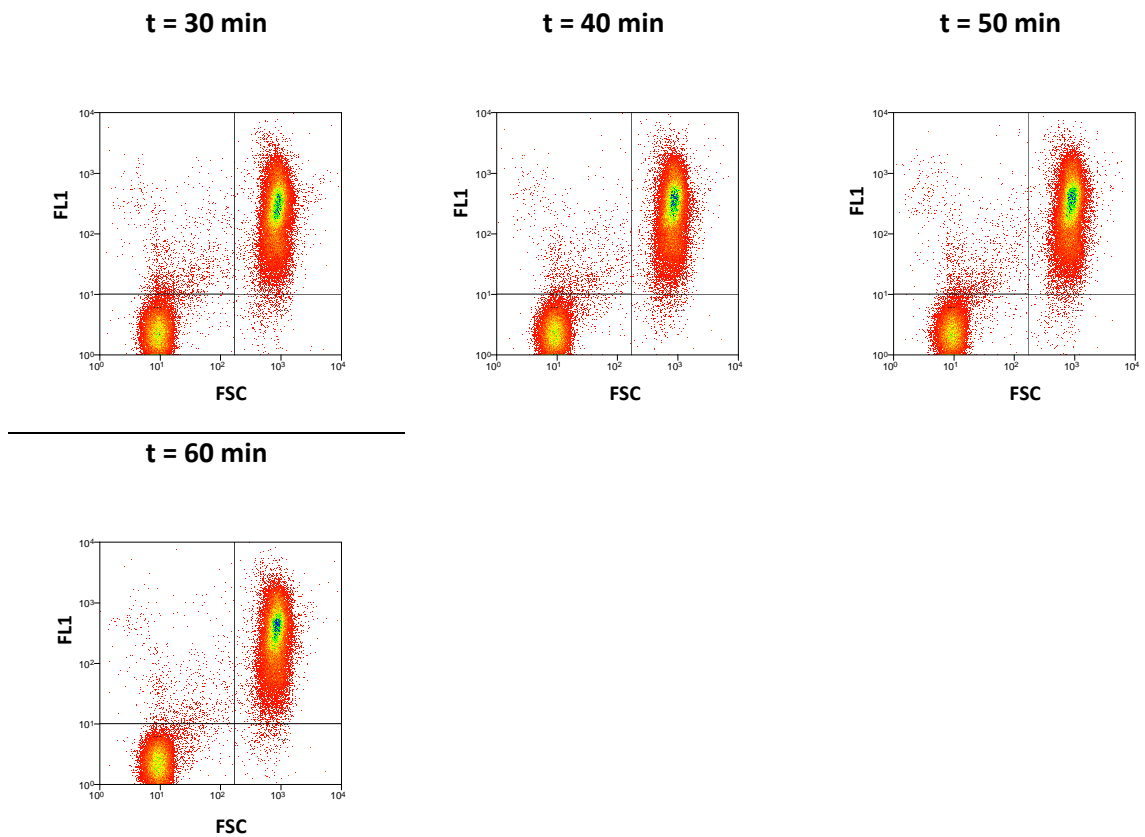


**t = 15 min**

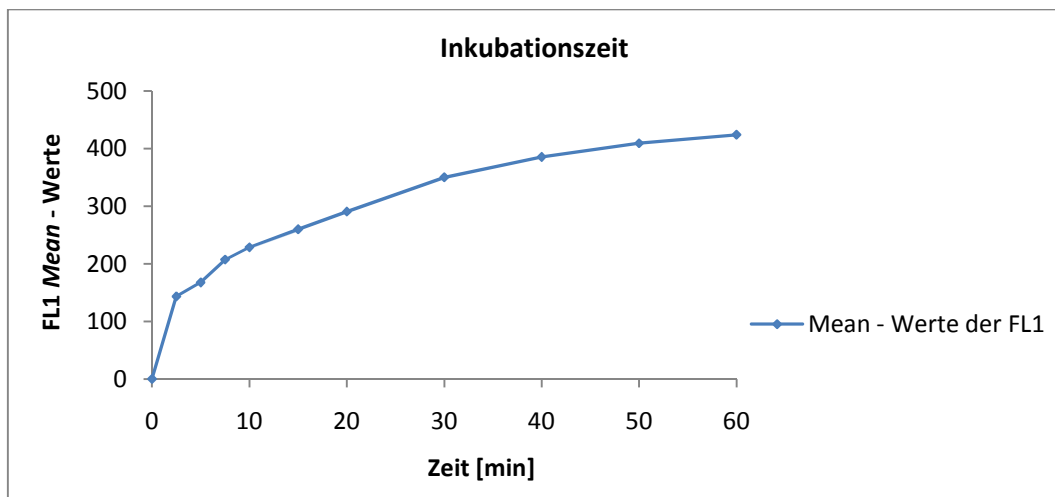


**t = 20 min**





In dem folgenden Diagramm sind die ermittelten *Mean* - Werte der FL1, die dem rechten oberen Quadranten entnommen wurden, gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

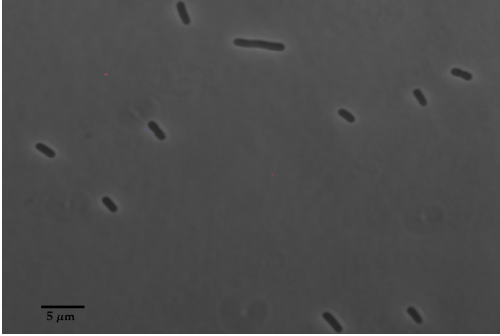
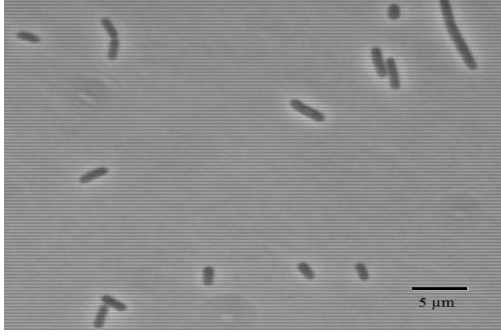
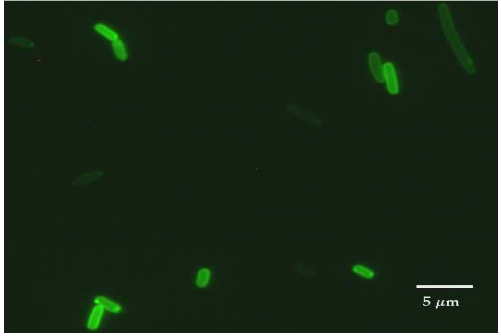
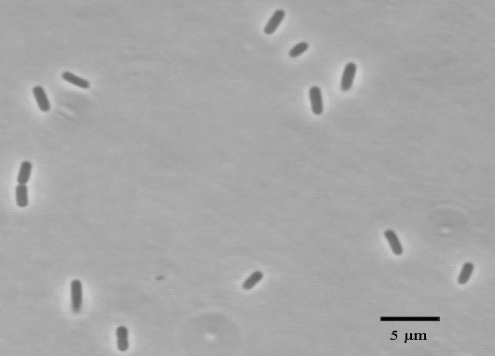
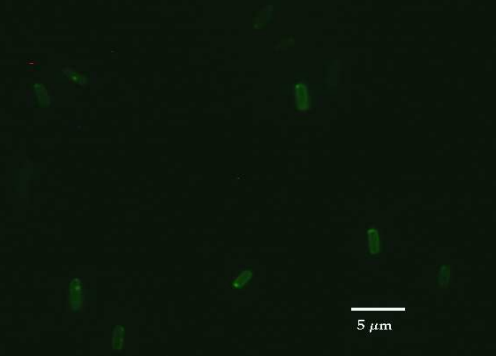
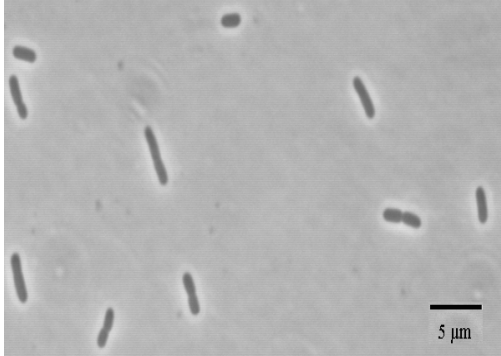
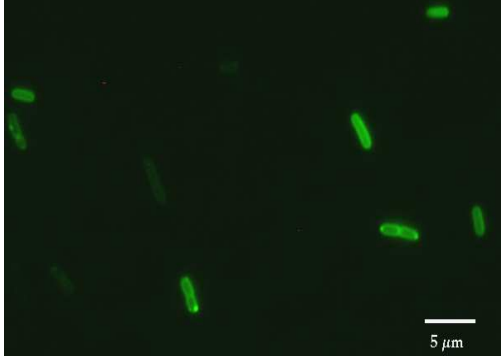


Nach etwa 1 h nähert sich die Kurve der FL1 einem Maximum, welches bei 424,05 liegt.

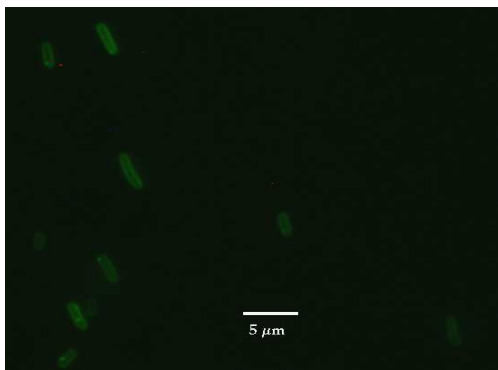
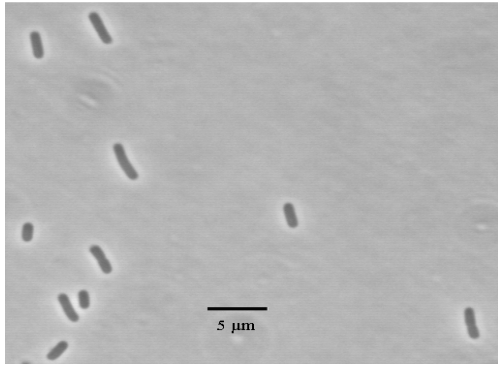
Für die vorgenommenen Färbungen wurde eine Inkubationszeit von 10 min verwendet, wobei ein ermittelter *Mean* - Wert von 228,56 vorliegt. Demnach ist mehr als die Hälfte der maximalen Färbung nach 10 min erfolgt, wobei mittels fluoreszenzmikroskopischer Betrachtungen ausschließlich eine Färbung der Zellmembran festgestellt wurde.



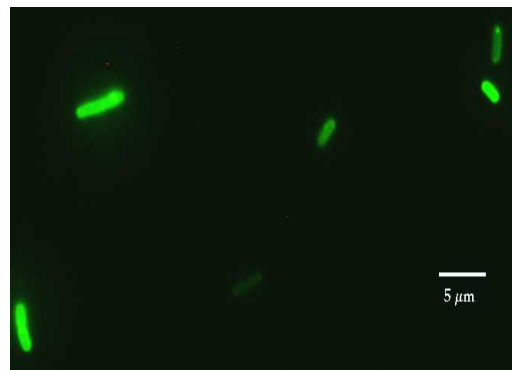
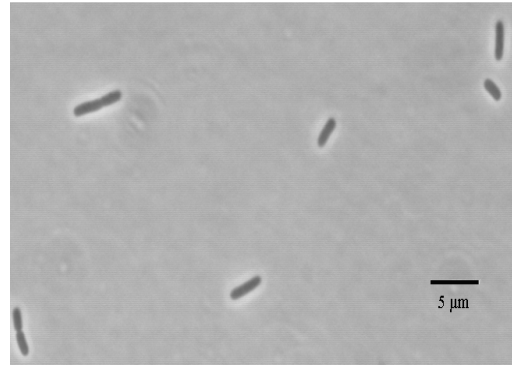
Es folgen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DiOC<sub>6</sub>(3) - gefärbten Zellen nach CCCP - und Valinomycinbehandlung. Für alle Färbungen wurde eine Farbstoffkonzentration von 50 nM mit einer Inkubationszeit von 10 min verwendet.

Kontrolle: ungefärbte Zellen (-/- Ansatz)	DiOC <sub>6</sub> (3) - gefärbte Zellen, c <sub>End</sub> = 50 (-/- Ansatz)
	 
CCCP	Valinomycin
<p>c = 15 μM</p>  	<p>c = 10 μM</p>  

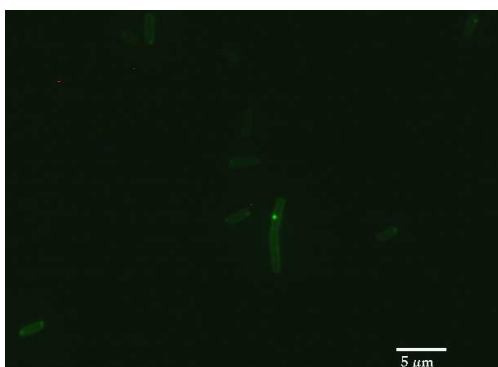
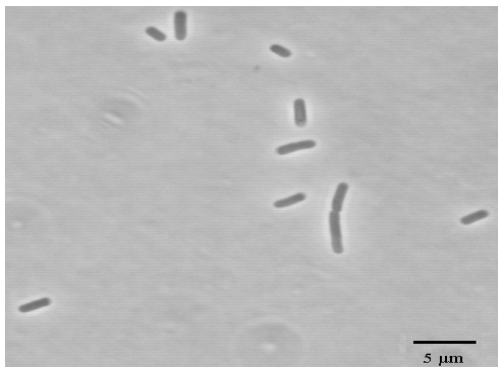
**c = 30  $\mu$ M**



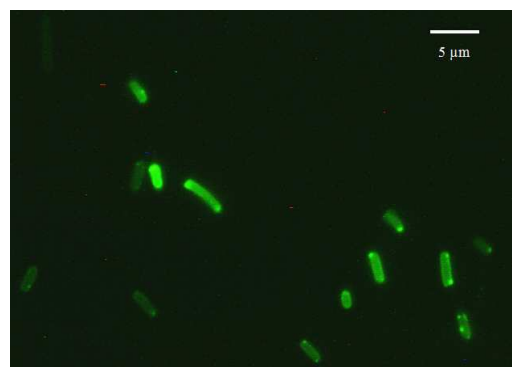
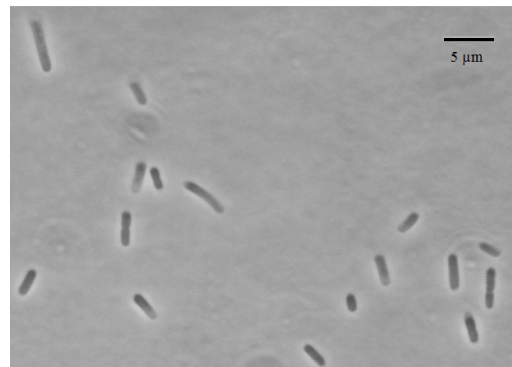
**c = 20  $\mu$ M**



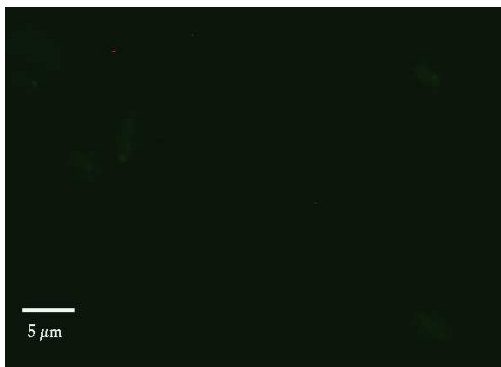
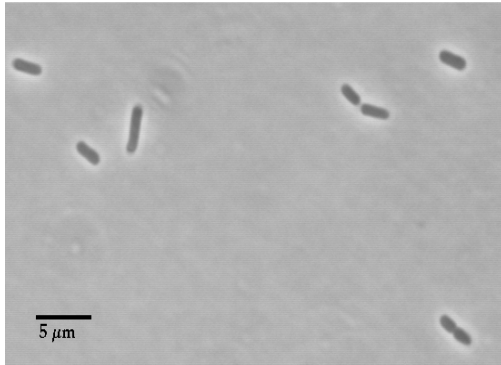
**c = 50  $\mu$ M**



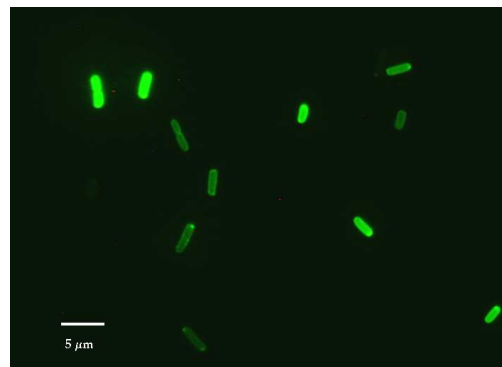
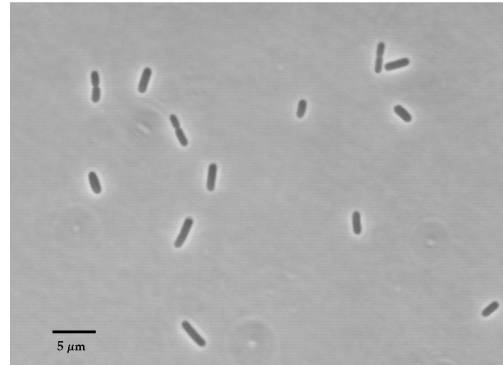
**c = 50  $\mu$ M**



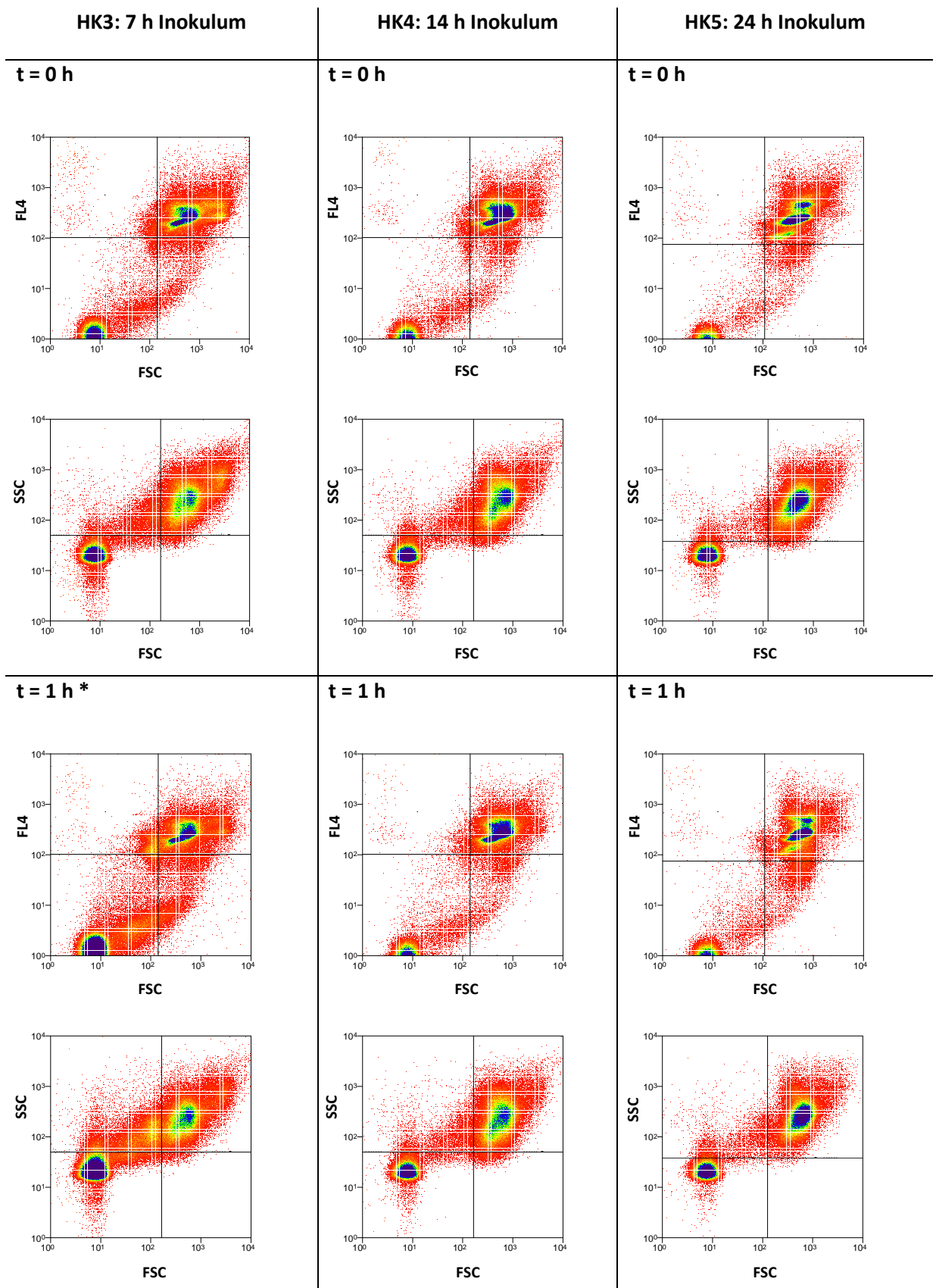
**c = 100  $\mu$ M**



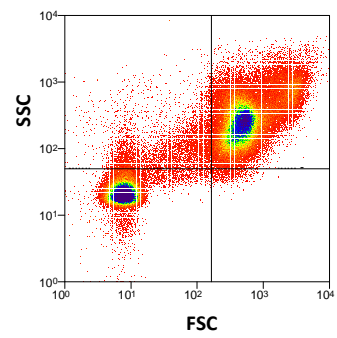
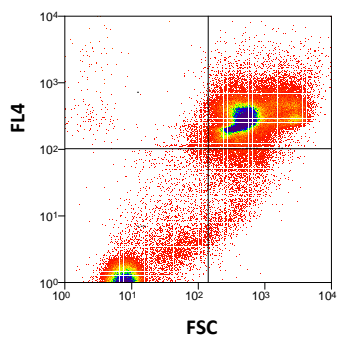
**c = 100  $\mu$ M**



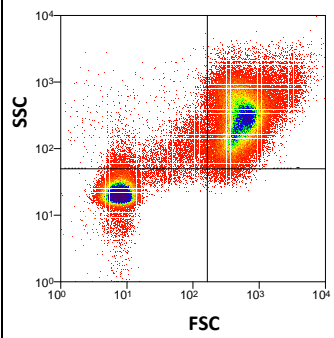
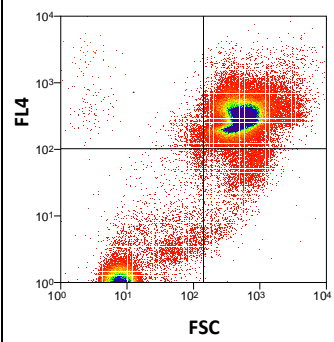
siehe 3.2.1.4 Sortierung der Subpopulationen



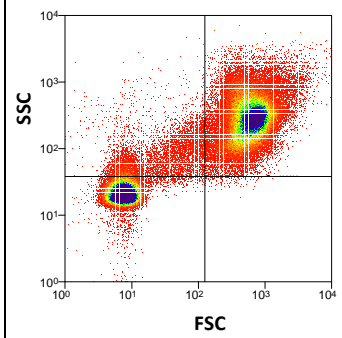
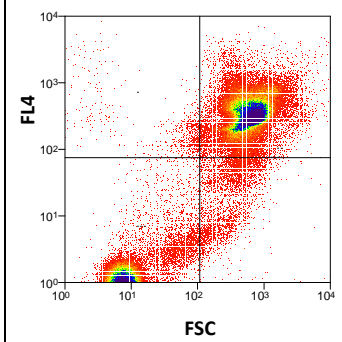
**t = 2 h**



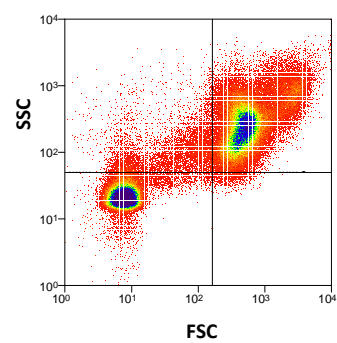
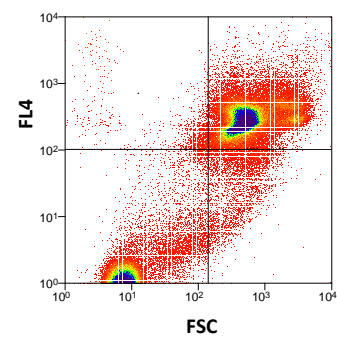
**t = 2 h**



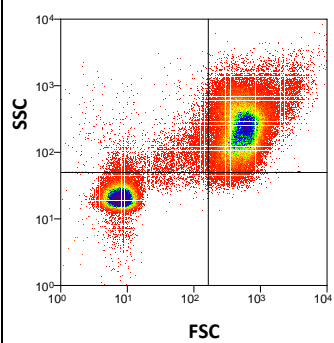
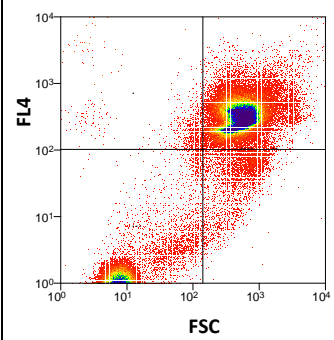
**t = 2 h**



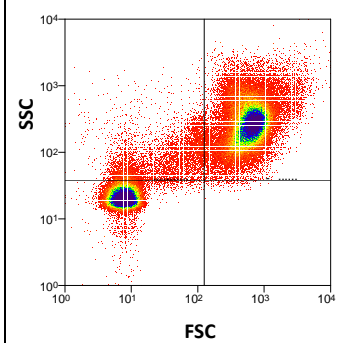
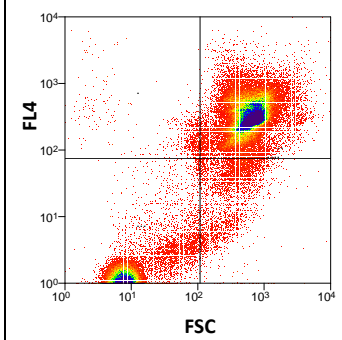
**t = 3 h**



**t = 3 h**



**t = 3 h**



**\* Kontamination in der DAPI - Färbelösung**

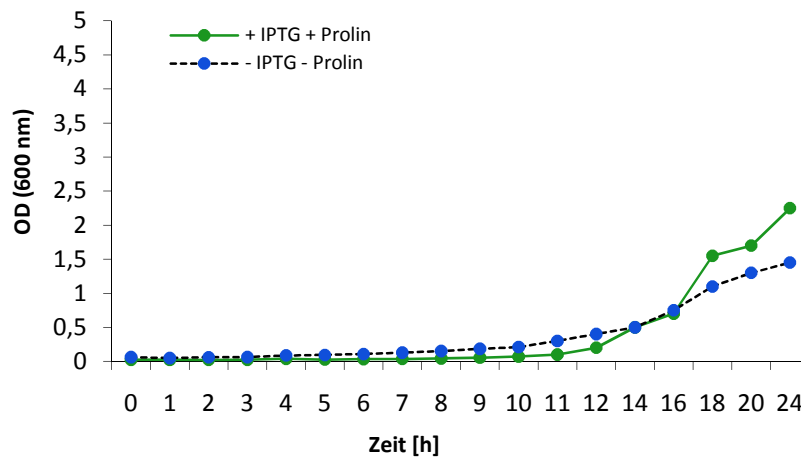
Die folgende Tabelle stellt die prozentualen Anteile der vermutlich „*inclusion body*“ - tragenden Subpopulationen in den drei HK (HK3 - 5) dar. Die Werte wurden anhand der FSC/SSC - Dotplots berechnet.

Zeit [h]	HK3	HK4	HK5
0	16.2 %	4.8 %	3.9 %
1	9.7 % *	4.9 %	3.0 %
2	11.5 %	4.4 %	3.7 %
3	10.5 %	3.5 %	3.0 %

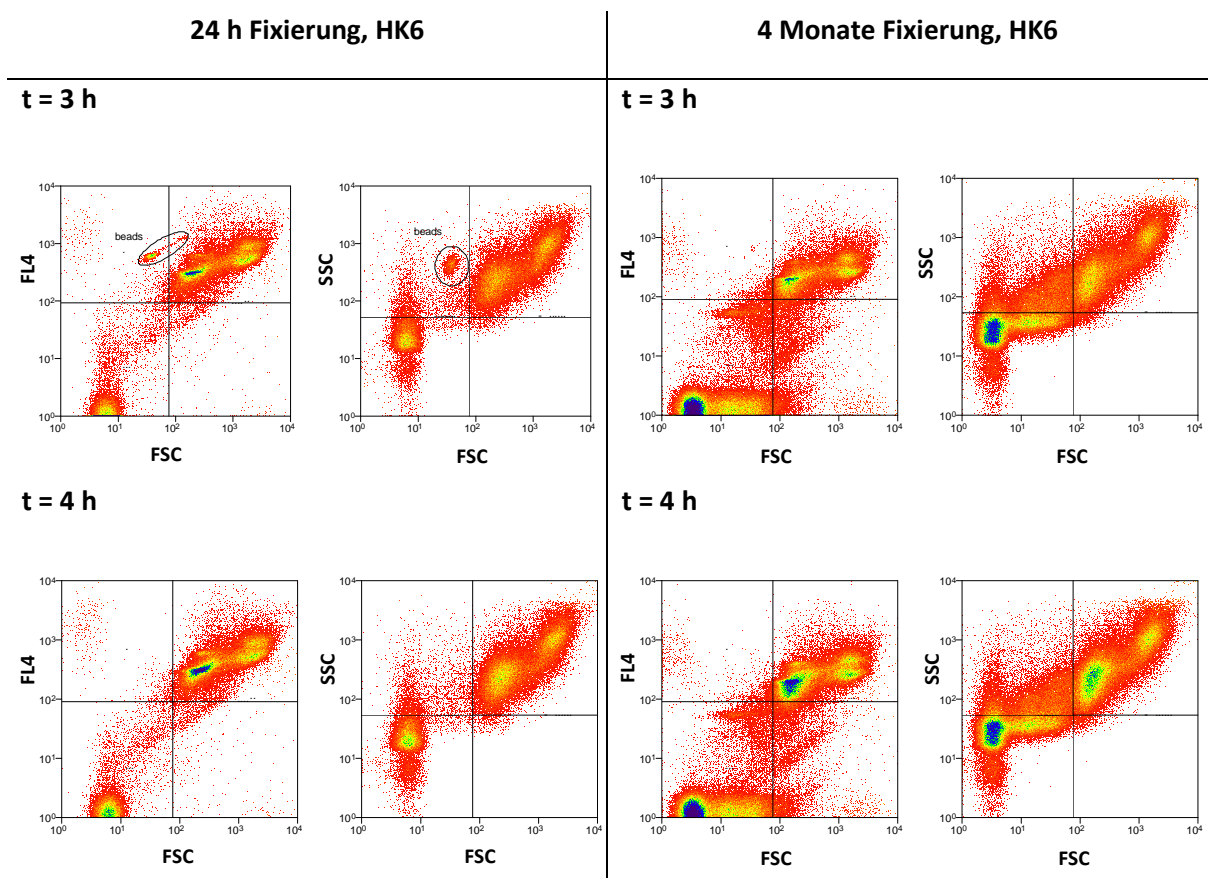
\*Da bei dieser Probe eine Kontamination der DAPI - Färbelösung vorlag, kann es zu einer Abweichung dieses Wertes kommen.

### siehe 3.2.2 Flowzytometrische Untersuchung des Stammes pEKE-hyp1

Die folgende Abbildung zeigt den Wachstumsverlauf des Stammes pEKE-hyp1 in beiden Induktionsansätzen (HK6). [59]



Die folgenden flowzytometrischen Abbildungen zeigen den Vergleich zwischen 4 Monate gelagerten und 24 h fixierten Proben der HK6.



## Anlagen, Teil 2

### siehe 2.2.6.4 Auswertung der massenspektrometrischen Daten

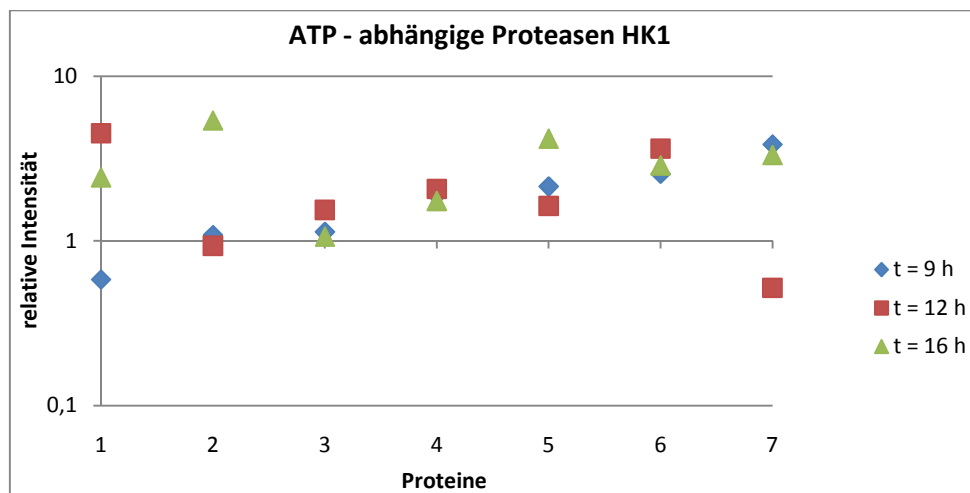
Alle Rohdaten der *MaxQuant* - Software sind auf der beiliegenden CD zu finden.

Die Normalisierung der *MaxQuant* - Daten wurde wie folgt vorgenommen:

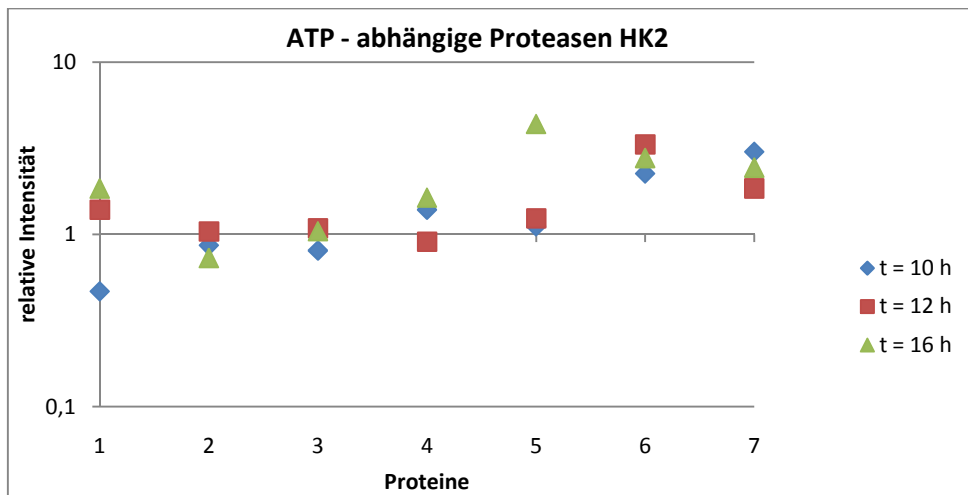
1. Division der Intensitätswerte des Proteins durch die Anzahl der jeweils detektierten Peptide
2. Bildung der Spalten - Summe dieser Quotienten (je Probe eine Summe)
3. Bildung des Mittelwertes dieser Summen
4. Division des Mittelwertes durch die einzelnen Summen, um den Normalisierungsfaktor für jede Probe zu ermitteln
5. Multiplikation des jeweiligen Faktors mit den ermittelten Quotienten aus 1.

### siehe 3.3.1.1 Gesamtproteom

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die unterschiedlichen Expressionen ATP - abhängiger Proteasen in den beiden HK. Hierfür wurden die relativen Intensitäten berechnet, durch Division der (+/+) - Werte durch die der (-/-) - Ansätze. Die nachfolgende Tabelle (siehe S. A - 20) fasst die dargestellten Proteine zusammen.

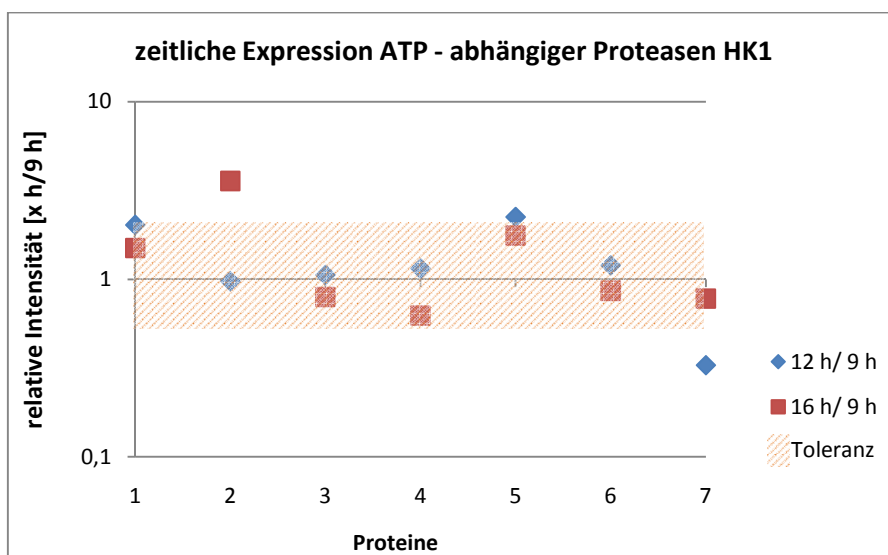


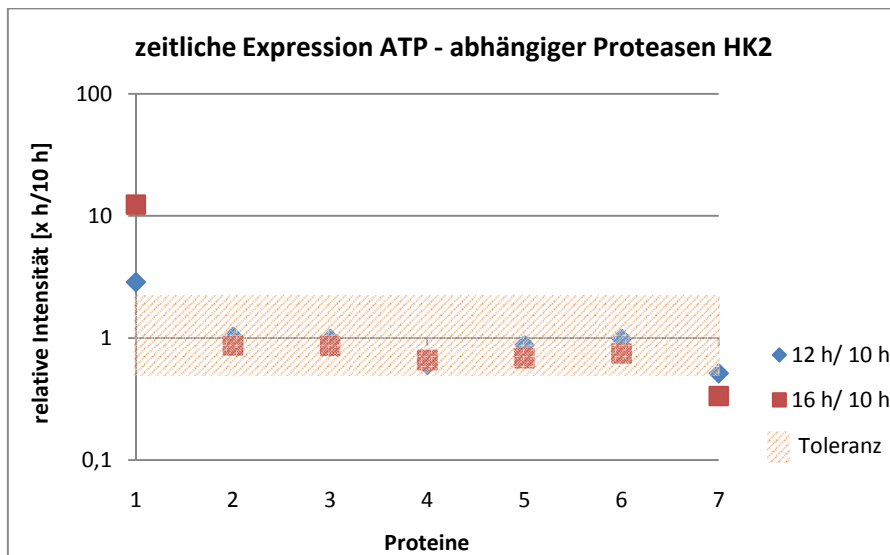




An den beiden Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass im (+/+) - Ansatz in vielen Fällen eine Hochregulation der dargestellten Proteasen stattgefunden hat (v. a. HK1). So wäre ein Abbau von Hyp1 durch ATP - abhängige Proteasen durchaus denkbar.

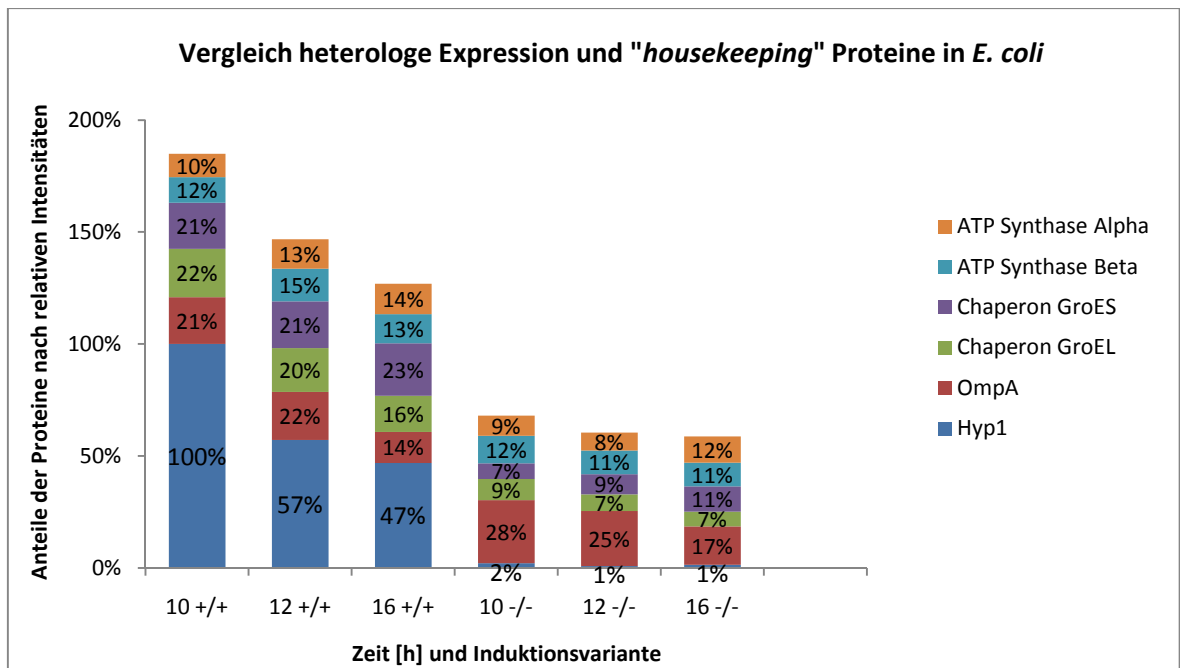
Die folgenden beiden Abbildungen sollen den zeitlichen Verlauf der Expression der ATP - abhängigen Proteasen in den HK1 und HK2 zeigen. Hierfür wurden die Intensitätswerte der Zeitpunkte t = 12 h und 16 h in Relation zu t = 9 h (bzw. 10 h) berechnet. Dabei sind nur bedingt Abweichungen zu erkennen. Die nachfolgende Tabelle stellt die dargestellten Proteine zusammen.





<b>1</b>	ATP - abhängige Clp Protease proteolytische Untereinheit (gi 110640698)	<b>5</b>	DNA - bindende ATP - abhängige Protease La (gi 110640700)
<b>2</b>	ATP - abhängige Clp Protease ATP - bindende Untereinheit (gi 157160405)	<b>6</b>	ATP - abhängige Protease ATP - bindende Untereinheit HslU (gi 110644267)
<b>3</b>	ATP - abhängige Metalloprotease (gi 157162661)	<b>7</b>	ATP - abhängige Protease Peptidaseuntereinheit (gi 110644268)
<b>4</b>	ATP - abhängige Protease ATP - bindende Untereinheit ClpX (gi 110640699)		


Die folgende Abbildung zeigt den Vergleich der Hyp1 - Menge der HK2 in Zusammenhang mit fünf „housekeeping“ Proteinen von *E. coli*. Der maximale Wert zum Zeitpunkt 10 h des (+/+) - Ansatz wurde auf 100 % festgelegt, um alle weiteren Intensitäten in Relation setzen zu können.




Die folgenden drei Tabellen stellen die hoch - bzw. runterregulierten Proteine des Stammes *putA\_pEKE-hyp1* zu den Zeitpunkten t = 9 h, 12 h und 16 h der HK1 zusammen. Dafür wurden alle Proteine mit relativen Intensitäten „ $\geq 5$ “ bzw. „ $\leq 0,2$ “ beachtet. Die beiliegende CD enthält die erweiterten Tabellen, d.h. alle Proteine die mit einem Faktor „ $\geq 2$ “ bzw. „ $\leq 0,5$ “ abweichen, wurden einbezogen.

t = 9 h Hochregulation	rel. Int [(+/+)/(-/-)]
L-proline 4-hydroxylase	170.5089697
serine transporter	80.46908446
ribonuclease III	22.80465569
heat shock protein IbpA	13.96857098
hypothetical protein ECP_3701	10.47139735
peroxidase/catalase HPI	9.581368678
cysteine desulfurase ATPase component	8.822150487
colicin I receptor	7.589334197
outer membrane-specific lipoprotein transporter subunit LolC	7.26894987
ABC transporter ATP-binding protein	5.874836837
hypothetical protein ECP_1732	5.589635162
sulfate/thiosulfate transporter subunit	5.228467825
acetolactate synthase 2 catalytic subunit	5.103789499
glycine betaine transporter ATP-binding subunit	5.011291922
t = 9 h Runterregulation	rel. Int [(+/+)/(-/-)]
azoreductase	0.195200965
putative ATPase	0.16000278
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.147889743
gamma-glutamyl-gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	0.138167311
peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein	0.128956441
oligopeptide transporter permease	0.118104039
phosphoenolpyruvate synthase	0.114379573
glycosyl hydrolase	0.110639698
universal stress protein G	0.102471863
shikimate 5-dehydrogenase	0.075015924
hypothetical protein ECP_2310	0.009750418


 bei allen 3 Zeitpunkten


 bei 2 Zeitpunkten

 bei 1 Zeitpunkt

<b>t = 12 h Hochregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(-/-)]</b>
L-proline 4-hydroxylase	63.69138983
acetolactate synthase 2 catalytic subunit	52.89529167
S-adenosylmethionine decarboxylase	29.55466904
peroxidase/catalase HPI	8.443223046
heat shock protein IbpA	7.105399976
ATP-dependent RNA helicase DeaD	6.422165898
quinolinate synthetase	6.362159187
hypothetical protein ECP_0667	5.616480288
<b>t = 12 h Runterregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(-/-)]</b>
3-isopropylmalate dehydrogenase	0.196223919
hypothetical protein ECP_1625	0.186596044
glutathione reductase	0.181933271
glucose-6-phosphate isomerase	0.171850645
exoribonuclease R	0.168420312
outer membrane lipoprotein	0.164294057
putative cytoplasmic protein	0.163016351
transcriptional regulator NarL	0.153148538
2,5-diketo-D-gluconate reductase A	0.152487197
superoxide dismutase	0.151910041
cysteine desulfurase ATPase component	0.143486837
hypothetical protein ECP_0173	0.141569283
hypothetical protein ECP_4504	0.127508438
putative cytoplasmic protein	0.125034899
maltose ABC transporter periplasmic protein	0.119472506
hypothetical protein ECP_2228	0.11677381
putrescine transporter subunit: periplasmic-binding component of ABC superfamily	0.11392267
arginine ABC transporter, periplasmic arginine-binding protein ArtI	0.101306599
sulfate transporter subunit	0.09863553
nitrogen regulatory protein P-II 2	0.079970677
glutamate--cysteine ligase	0.070193711
hypothetical protein ECP_0405	0.066440781
activator of Der GTPase	0.025762966


 bei allen 3 Zeitpunkten


 bei 2 Zeitpunkten


 bei 1 Zeitpunkt

<b>t = 16 h Hochregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(-/-)]</b>
L-proline 4-hydroxylase	58.23487469
acetolactate synthase 2 catalytic subunit	57.51709135
serine transporter	47.28852893
heat shock protein IbpA	22.52612649
RNA-binding protein Hfq	13.7278024
ferritin	12.93833619
peroxidase/catalase HPI	11.47805684
outer membrane-specific lipoprotein transporter subunit LolC	9.211194258
(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	8.92925455
ATP-dependent RNA helicase DeaD	8.865945304
phosphoglycerate mutase	8.712791916
bifunctional aspartate kinase II/homoserine dehydrogenase II	7.621177523
glycine betaine transporter ATP-binding subunit	7.199499424
aminotransferase AlaT	7.071560562
biopolymer transport protein ExbB	6.984514198
elongation factor Ts	6.650938252
multidrug resistance protein A	6.414798384
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	5.372365704
quinolinate synthetase	5.082533925
<b>t = 16 h Runterregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(-/-)]</b>
putative ATPase	0.198668925
transketolase	0.192743474
hypothetical protein ECP_1625	0.191210026
lipoprotein YdcL precursor	0.190246636
shikimate 5-dehydrogenase	0.189176022
LysM domain/BON superfamily protein	0.188496838
fructose 1,6-bisphosphatase II	0.171055079
glutamate decarboxylase beta	0.161031393
hypothetical protein ECP_1732	0.157256956
pyrroline-5-carboxylate reductase	0.153929018
2,5-diketo-D-gluconate reductase A	0.151336342
phosphoenolpyruvate synthase	0.145155603
outer membrane protein induced after carbon starvation	0.142128085
glutathione transporter ATP-binding protein, ABC superfamily	0.131242659

superoxide dismutase	0.129371434
ribonuclease activity regulator protein RraA	0.127684328
glutaredoxin 2	0.118627407
ATP-dependent RNA helicase HrpA	0.115369968
transcriptional regulator NarL	0.108719943
hypothetical protein ECP_0405	0.095056959
queuosine biosynthesis protein QueC	0.095004696
trifunctional transcriptional regulator/proline dehydrogenase *	0.06499735
predicted CoA-binding protein with NAD(P)-binding Rossmann-fold domain	0.055219148

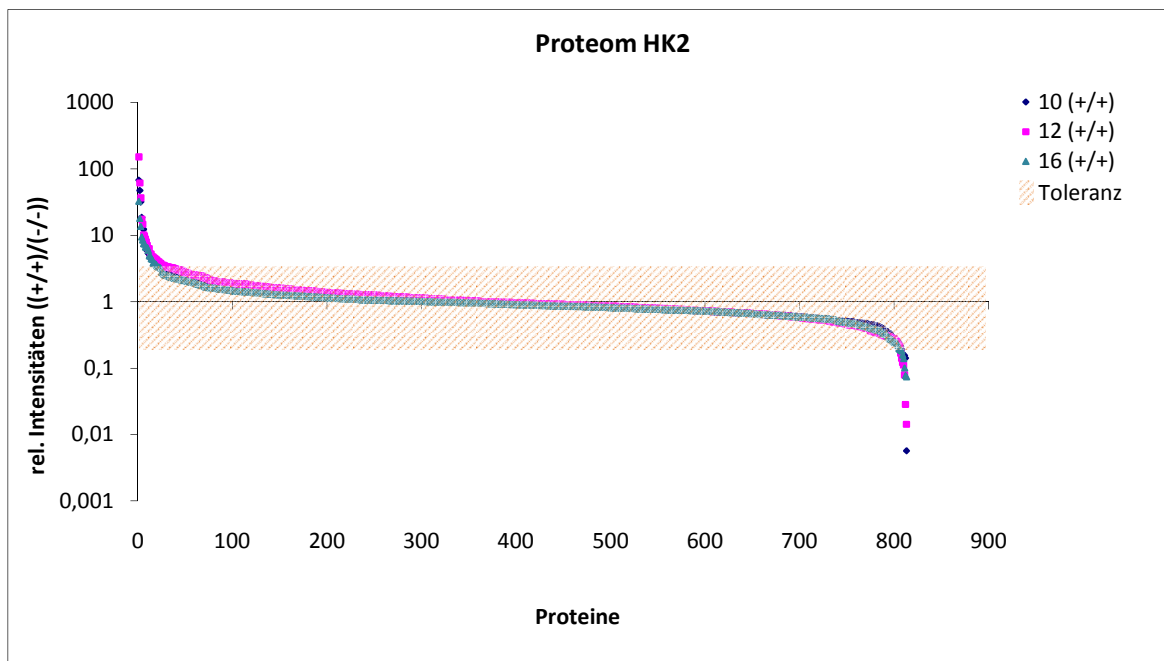
 bei allen 3 Zeitpunkten

 bei 2 Zeitpunkten

 bei 1 Zeitpunkt

\* Das Gen *putA* wurde in diesem Stamm deletiert, dennoch kam es zur Expression des Proteins PutA. Inwieweit diese Deletion erfolgte, ist nicht genau bekannt. So kann es bei dem Löschen einzelner Genabschnitte dennoch zu einer Proteinexpression kommen, jedoch liegt das Polypeptid fehl - bzw. unvollständig gefaltet vor. So konnten mittels LC - MS - Analyse einzelne Peptide von PutA identifiziert werden, wobei die Anzahl der detektierten Peptide und die Intensitätswerte im Gegensatz zu dem Stamm pEKE-*hyp1* (keine *putA* - Deletion) stark vermindert sind.


Die folgende graphische Darstellung zeigt das Expressionsprofil der HK2 des Stammes *putA\_pEKE-hyp1*. Die Vorgehensweise zur Berechnung der relativen Intensitäten erfolgte analog zu HK1, d.h. der (-/-) - Ansatz diente als Referenz. Dabei wurde der Toleranzbereich analog zu HK1 festgelegt, d.h. signifikant sind die Werte, die mit einem Faktor „ $\geq 5$ “ bzw. „ $\leq 0,2$ “ abweichen. Des Weiteren wurden die Proteine nicht berücksichtigt, die in mindestens einer Probe eine Intensität gleich „0“ besaßen. Die absteigende Sortierung der Quantitäten erfolgte für jeden Zeitpunkt getrennt.







Die folgenden drei Tabellen stellen die hoch – bzw. runterregulierten Proteine der HK2 – analog zu HK1 – dar. Dabei wurden die Zeitpunkte t = 10 h, 12 h und 16 h betrachtet. Als signifikant gelten die Proteine, die mit einem Faktor „ $\geq 5$ “ bzw. „ $\leq 0,2$ “ abweichen. Auf der beiliegenden CD sind die erweiterten Tabellen zu finden, bei denen alle relativen Intensitäten der Werte „ $\geq 2$ “ bzw. „ $\leq 0,5$ “ als signifikant gelten.


<b>t = 10 h Hochregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(-/-)]</b>
heat shock chaperone IbpB	67.86747484
L-proline 4-hydroxylase	47.42410725
heat shock protein IbpA	31.92664989
hypothetical protein ECP_3701	18.63020645
serine transporter	12.71018644
lipopolysaccharide biosynthesis protein WzzE	12.33179965
serine/threonine transporter SstT	9.344015359
biopolymer transport protein ExbB	6.886774712
acetolactate synthase 2 catalytic subunit	6.039860659
oligopeptidase A	6.011853305
3-dehydroquinate dehydratase	5.371592106
carbon starvation protein A	5.176782307
<b>t = 10 h Runterregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(-/-)]</b>
L-threonine 3-dehydrogenase	0.191918876
hypothetical protein ECP_1123	0.161594187
3-isopropylmalate dehydratase small subunit	0.156329288
aminotransferase AlaT	0.155836544
phosphoserine phosphatase	0.142146527
aromatic amino acid transporter	0.00571251


 bei allen 3 Zeitpunkten


 bei 2 Zeitpunkten

 bei 1 Zeitpunkt

<b>t = 12 h Hochregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(--)]</b>
heat shock chaperone lbpB	151.6642109
L-proline 4-hydroxylase	61.60995223
heat shock protein lbpA	36.71938955
serine transporter	17.43537615
bifunctional chorismate mutase/prephenate dehydrogenase	14.71332095
bifunctional phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	10.19760361
peroxidase/catalase HPI	9.698500474
glycerol-3-phosphate acyltransferase	8.83794149
biopolymer transport protein ExbD	7.919182826
fumarate hydratase class I, aerobic	7.063599043
leucyl-tRNA synthetase	6.295419389
C32 tRNA thiolase	6.293723562
spermidine N(1)-acetyltransferase	5.294544867
lysine transporter	5.217733887
<b>t = 12 h Runterregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(--)]</b>
3-isopropylmalate dehydrogenase	0.168150691
putative GTP-binding protein YjiA	0.14011645
oligopeptide transporter permease	0.121680388
50S ribosomal protein L32	0.111233645
D-alanyl-alanine synthetase A	0.07935196
glutathione ABC transporter, periplasmic glutathione-binding protein GsiB	0.028332908
hypothetical protein ECP_2310	0.014226971

 bei allen 3 Zeitpunkten

 bei 2 Zeitpunkten

 bei 1 Zeitpunkt

<b>t = 16 h Hochregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(-/-)]</b>
L-proline 4-hydroxylase	32.61067568
heat shock chaperone IbpB	17.96566531
heat shock protein IbpA	13.62054021
serine transporter	9.476395925
biopolymer transport protein ExbD	8.52111155
phosphoglycerate mutase	7.493714745
50S ribosomal protein L32	7.391556988
translation inhibitor protein RaiA	6.674941337
AMP nucleosidase	6.606627
cell division protein MukB	6.510001017
selenophosphate synthetase	5.92589502
<b>t = 16 h Runterregulation</b>	<b>rel. Int [(+/+)/(-/-)]</b>
ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	0.197744699
3-isopropylmalate dehydrogenase	0.191781744
FKBP-type 16 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.186936032
hypothetical protein ECP_2310	0.182094384
oligopeptide transport ATP-binding protein OppF	0.157185838
transcriptional regulator NarL	0.139405359
phosphoserine phosphatase	0.101013541
oligopeptide transporter permease	0.077517405
NADH dehydrogenase subunit A	0.074299395



bei allen 3 Zeitpunkten



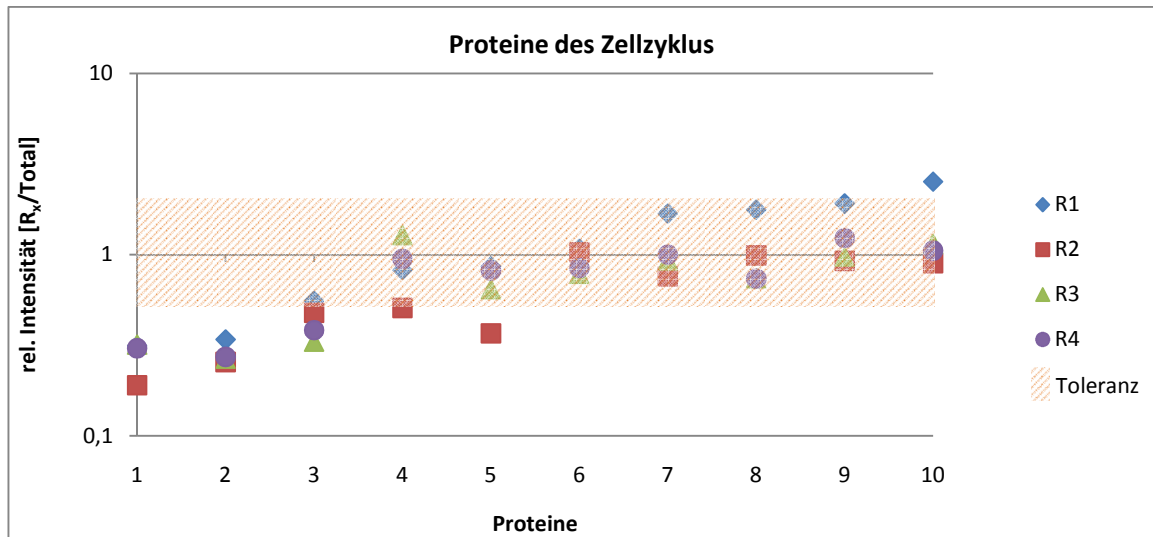
bei 2 Zeitpunkten



bei 1 Zeitpunkt

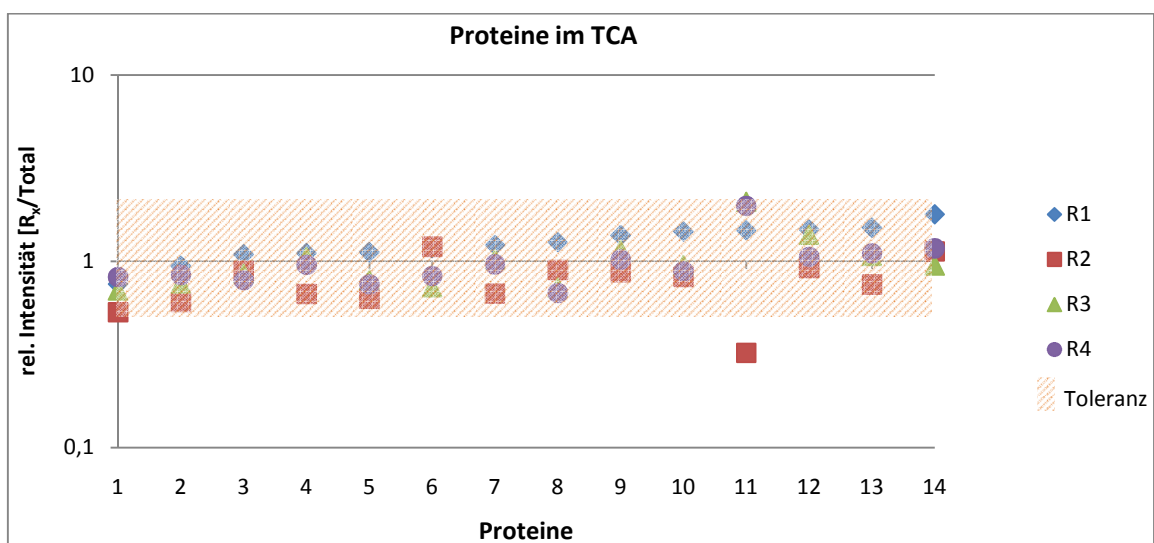
### siehe 3.3.2 Der Stamm pEKE-*hyp1*

Die folgenden Abbildungen und Tabellen stellen die Proteine des Zellzyklus, TCA und der Stressantwort für den Stamm pEKE-*hyp1* – analog zu *putA\_pEKE-hyp1* – gegenüber.



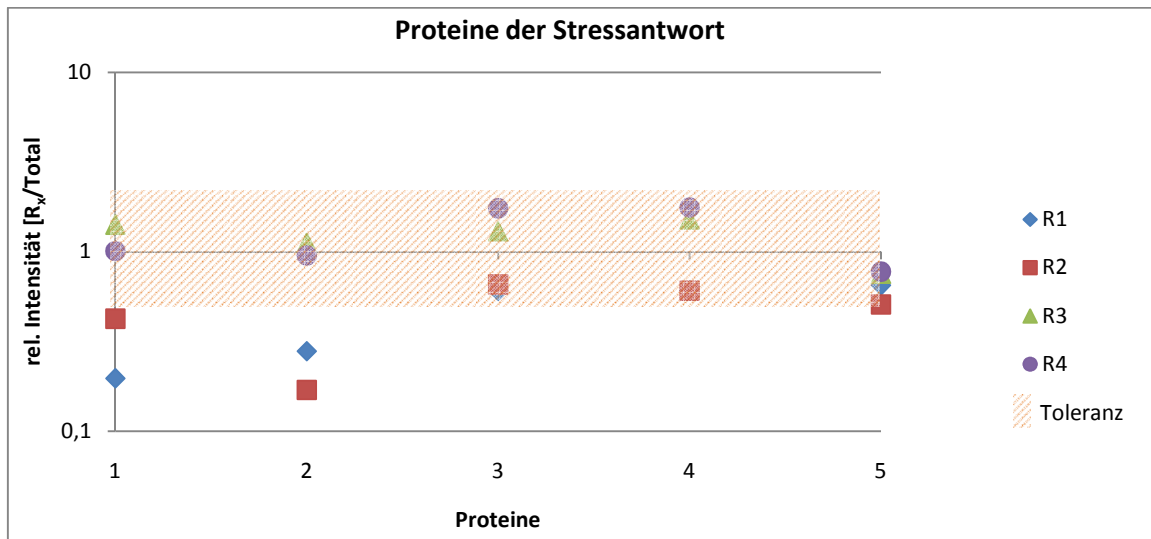
#### Zusatz Zellzyklus

1	Zellteilungsprotein ZapB (gi 15804517)	6	UDP - N - acetylglucosamin 1 - carboxyvinyltransferase (gi 110643429)
2	Peptidyl - Prolyl - cis/trans – Isomerase (gi 157159963)	7	Zellteilungsprotein MukB (gi 110641121)
3	Zellteilungsprotein ZapA (gi 110643058)	8	DamX ( gi 16131266)
4	Zellteilungsprotease FtsH (gi 157162661)	9	Zellteilungsprotein FtsA (gi 110640307)
5	Zellteilungsprotein FtsZ (gi 110640308)	10	Zellteilungsprotein ZipA Homolog (gi 110642596)



### Zusatz TCA

1	Malatdehydrogenase (gi 110643470)	8	Dihydrolipoyllysin - Rest Succinyltransferase (gi 157160206)
2	Succinyl - CoA Ligase Untereinheit Beta (gi 110640936)	9	Phosphoenolpyruvatcarboxylase (gi 110644296)
3	Isocitratdehydrogenase (gi 110641313)	10	Succinatdehydrogenase Flavoproteinuntereinheit (gi 110640932)
4	Aconitathydratase 2 (gi 157159586)	11	Malat:Quinon Oxidoreduktase (gi 157161692)
5	Malatsynthase A (gi 16131840)	12	Citratsynthase (gi 110640928)
6	Fumarathydratase Klasse II (gi 110641733)	13	Succinatdehydrogenase Eisen - Schwefel Untereinheit (gi 16128699)
7	2 -Oxoglutaratdehydrogenase E1 Komponente (gi 110640934)	14	Succinyl - CoA Ligase Untereinheit Alpha (gi 110640937)



### Zusatz Stressantwort

1	Hitzeschockprotein IbpA (gi 110644030)	4	Chaperonprotein DnaJ (gi 16128009)
2	Chaperonprotein Dnak (gi 110640227)	5	Transkription - Elongationsprotein NusA (gi 157162654)
3	Chaperonprotein HscA (gi 110642691)		

# Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 12.09.2011

---

Linda Grosche